

**Bioaktive forbindelser i**  
***Biophytum petersianum***

**Etnofarmakologiske studier i Mali**

**Celine Nguyen**



Masteroppgave i farmasi  
Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelig fakultet

**UNIVERSITETET I OSLO**

Mai 2011



**Bioaktive forbindelser i**  
***Biophytum petersianum***  
**Etnofarmakologiske studier i Mali**

**Celine Nguyen**

Masteroppgave i farmasi  
Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelig fakultet

**UNIVERSITETET I OSLO**

Mai 2011

Veiledere  
Førsteamanuensis Helle Wangenstein  
Professor emeritus Karl Egil Malterud  
Professor Berit Smestad Paulsen  
Professor Drissa Diallo



## **Forord**

Denne masteroppgaven ble utført ved avdeling for farmakognosi, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, i tidsrommet april 2010 til mai 2011.

Jeg ønsker først og fremst å takke Helle Wangensteen og Karl Egil Malterud for gode råd og engasjerende veiledning under arbeidet med masteroppgaven. Jeg vil også takke Berit Smestad Paulsen for god støtte underveis.

Ellers vil jeg takke reisefølget mitt Selma Meskini og Hao Nhat Tran Le for en fin tur, og Drissa Diallo for god veiledning og planlegging av intervjuer i Mali.

Til slutt vil jeg takke alle involverte ved avdelingen for at de har tatt godt vare på meg og bidratt til et hyggelig hovedfagsår.

Oslo, mai 2011

Celine Nguyen



# Innholdsfortegnelse

1. Sammendrag .....	10
2. Forkortelser .....	12
3. Hensikt med oppgaven .....	13
4. Bakgrunn .....	14
4.1 <i>Biophytum petersianum</i> Klotzsch.....	14
4.1.1 Taksonomisk klassifisering .....	14
4.1.2 Botanikk .....	14
4.1.3 Tradisjonell bruk .....	15
4.1.4 Tidligere studier .....	16
4.2 Antioksidanter og frie radikaler .....	17
4.2.1 Antioksidanter .....	17
4.2.2 Frie radikaler .....	17
4.2.3 Oksidativt stress og antioksidantforsvar .....	18
4.3 Arakidonsyremetabolisme og 15-Lipoksygenase .....	18
4.3.1 Arakidonsyremetabolisme.....	18
4.3.2 15-Lipoksygenase.....	19
4.4 Flavonoider.....	19
4.4.1 Apigenin .....	21
5. Eksperimentelt.....	22
5.1 Materialer .....	22
5.1.1 Kjemikalier.....	22
5.1.2 Apparatutrustning.....	23
5.2 Metoder .....	25
5.2.1 Generelle metoder .....	25
5.2.2 Separasjonsmetoder.....	26
5.2.3 Identifikasjonsmetoder .....	31
5.2.4 Metode for måling av biologisk aktivitet .....	38
5.3 Eksperimentell utførelse.....	44
5.3.1 Utgangsmateriale.....	44
5.3.2 Fraksjonering av metanolræktraktet .....	44
5.3.3 Fraksjonering av EtOAc-ekstraktet .....	46
5.3.4 Videre separasjon av fraksjon E1 .....	48
5.3.5 Videre separasjon av fraksjon E1.2.....	50
5.3.6 Videre separasjon av fraksjon E1.2.2.....	52

5.3.7 Videre separasjon av fraksjon E1.6.....	52
5.3.8 Videre separasjon av fraksjon E1.6.4.....	54
5.3.9 Videre separasjon av fraksjon E1.6.4.3.....	55
5.3.10 Videre separasjon av fraksjon E1.6.4.3.8.....	55
5.3.11 Videre separasjon av fraksjon E4 og E5 .....	56
5.3.12 Videre separasjon av fraksjon E4-5.2 .....	58
5.3.13 Videre separasjon av fraksjon E4-5.2.5 .....	59
5.3.14 Videre arbeid med fraksjon E1.6.4.3.8.7 og E4-5.2.5.4.....	60
5.3.15 Videre separasjon av fraksjon E4-5.2.6 .....	60
5.3.16 Videre separasjon av fraksjon E4-5.2.7 .....	61
5.3.17 Videre separasjon av fraksjon E4-5.3 .....	62
5.3.18 Videre separasjon av fraksjon E4-5.3.5 .....	62
5.3.19 Videre separasjon av fraksjon E4-5.4 .....	63
5.3.20 Videre arbeid med fraksjon E4-5.3.5.6 og E4-5.4.4.....	64
5.3.21 Videre separasjon av fraksjon E6, E7 og E8.....	64
5.3.22 Videre separasjon av fraksjon E6-8.10 .....	66
5.3.23 Videre separasjon av fraksjon E6-8.11 .....	67
5.3.24 Videre separasjon av fraksjon E6-8.11.1 til E6-8.11.4 .....	67
5.3.25 Fraksjonering av BuOH-ekstraktet.....	68
5.3.26 Videre separasjon av fraksjon B5 og B6.....	69
6. Resultater og diskusjon .....	72
6.1 Isolasjon, strukturoppklaring og bioassay .....	72
6.1.1 Metanolrækstraktet.....	72
6.1.2 Fraksjonering av metanolrækstraktet .....	74
6.1.3 Fraksjonering av EtOAc-ekstraktet.....	79
6.1.4 Videre separasjon av fraksjon E1 .....	81
6.1.5 Videre separasjon av fraksjon E1.2.....	83
6.1.6 Videre separasjon av fraksjon E1.2.2.....	84
6.1.7 3,4-Dihydroksybenzosyre .....	87
6.1.8 Videre separasjon av fraksjon E1.6.....	88
6.1.9 Videre separasjon av fraksjon E1.6.4.....	89
6.1.10 Videre separasjon av fraksjon E1.6.4.3.....	90
6.1.11 Videre separasjon av fraksjon E1.6.4.3.8.....	90
6.1.12 Cassiaoccidentalin A .....	96
6.1.13 Videre separasjon av fraksjon E4-5 .....	97
6.1.14 Videre separasjon av fraksjon E4-5.2 .....	98
6.1.15 Videre separasjon av fraksjon E4-5.2.5 .....	99



6.1.16 Videre separasjon av fraksjon E4-5.2.6 .....	100
6.1.17 Videre separasjon av fraksjon E4-5.2.7 .....	101
6.1.18 Videre separasjon av fraksjon E4-5.3 .....	101
6.1.19 Videre separasjon av fraksjon E4-5.3.5 .....	102
6.1.20 Videre separasjon av fraksjon E4-5.4 .....	103
6.1.21 Videre arbeid med fraksjon E4-5.3.5.6 og E4-5.4.4.....	103
6.1.22 Videre separasjon av fraksjon E6-8 .....	104
6.1.23 Videre separasjon av fraksjon E6-8.10 .....	105
6.1.24 Videre separasjon av fraksjon E6-8.11 .....	107
6.1.25 Videre separasjon av fraksjon E6-8.11.1-4 .....	108
6.1.26 Fraksjonering av BuOH-ekstraktet.....	109
6.1.27 Videre separasjon av fraksjon B5-6 .....	110
7. Etnofarmakologiske studier .....	112
7.1 Etnofarmakologi.....	112
7.2 Mali .....	112
7.3 Tradisjonell medisin.....	114
7.4 Feltarbeid i Mali .....	115
7.4.1 Feltarbeid i Bamako .....	116
7.4.2 Feltarbeid i Siby-området.....	116
7.4.3 Feltarbeid i Dioila-området .....	118
7.4.4 Forklaringer til tabellene .....	123
7.4.5 Oppsummering av resultater fra healerintervjuer.....	123
8. Konklusjon .....	124
8.1 Forslag til videre arbeid.....	124
9. Vedlegg .....	126
9.1 Flytskjema .....	126
9.2 NMR-spektra .....	132
10. Kildeliste .....	144

# 1. Sammendrag

Tradisjonell medisin er en viktig del av helsetilbudet i Mali, og 80 prosent av befolkningen bruker tradisjonell medisin. Grunnen til dette er liten tilgjengelighet av konvensjonell medisin, og høy pris på konvensjonelle legemidler sammenlignet med inntektsnivå.

*Biophytum petersianum* Klotzsch (syn. *Biophytum umbraculum* Welw; Oxalidaceae) er en ettårig plante som blir brukt av mange healere i Mali. Planten brukes mot blant annet cerebral malaria, sårheling og magesmerter.

Av 38 healere intervjuet i Bamako, Siby- og Dioila-området brukte 34 healere *B. petersianum* i sin praksis. Av 20 ulike indikasjoner på bruk ble nevrologisk malaria, hemoroider og tykktarmslidelser hyppigst nevnt. Hele 17 av 34 healere brukte planten mot nevrologisk malaria. Dekokt av hele planten var den hyppigst oppgitte tilberedningsformen, og blandingen skulle i de fleste tilfeller drikkes, appliseres på de aktuelle behandlingsområdene eller pasienten skulle vaskes med dekoktet.

I denne studien ble metanolrækstraktet av *B. petersianum* ekstrahert med etylacetat og butanol. Dette ga etylacetat- butanol- og vannfase. Etylacetat- og butanol-fasen ble videre separert og fraksjonert ved bruk av kolonnekromatografi (Sephadex og versaflash) og undersøkt med NMR-spektroskopi. Utvalgte fraksjoner ble deretter videre separert og fraksjonert ved bruk av kromatografi. Dette resulterte i isolerte forbindelser som ble strukturoppklart ved  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -, APT-, DEPT-, COSY-, HMBC- og HSQC-NMR-spektroskopi.

Fra etylacetat-fasen ble 3,4-dihydroksybenzosyre isolert og identifisert. Det samme ble cassiaoccidentalin A, et sjeldent flavonglykosid, som kun er blitt rapportert en gang tidligere, fra planten *Cassia occidentalis* (Leguminosae). Det ble også isolert et nytt naturstoff, med antatt struktur apigenin 6-(2-propensyre). Ingen av disse forbindelsene er tidligere blitt isolert fra *B. petersianum*. Undersøkelse av NMR-spektra av fraksjoner fra butanolfasen tydet også på innhold av flavonglykosider.

Metanolrækstraktet, de ulike fasene etter ekstraksjon, 3,4-dihydroksybenzosyre og cassiaoccidentalin A ble testet for biologisk aktivitet ved DPPH-scavenging, hemming av 15-

lipoksygenase (15-LO) og hemming av xantin oksidase (XO). Utvalgte mellomfraksjoner ble også testet for hemming av XO.

Metanolrækstraktet og etylacetat-fasen var gode hemmere av XO, men dårlige scavengere av DPPH og hemmere av 15-LO. Butanol- og vannfasen var dårlige XO-hemmere og inaktive som 15-LO-hemmere og DPPH-scavengere. 3,4-Dihydroksybenzosyre var inaktiv som XO-hemmer, hadde lav 15-LO-hemmende effekt og moderat DPPH-scavengeraktivitet. Cassiaoccidentalin A hadde god 15-LO hemmende aktivitet, moderat XO-hemmende aktivitet, men var en dårlig DPPH-scavenger.

## 2. Forkortelser

Forkortelse	Fullstendig betegnelse
15-LO	15- Lipoksygenase
ACN	Acetonitril
APT	Attached Proton Test
<i>B. petersianum</i>	<i>Biophytum petersianum</i>
BuOH	Butanol
C	Karbon
CD <sub>3</sub> OD	Deuterert metanol
COSY	Correlation Spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhancement By Polarization Transfer
DMSO	Dimetylsulfoksid
DMT	Department of Traditional Medicine
DPPH	$\alpha,\alpha$ -Difenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl
ESI	Elektrosprayionisasjon
EtOAc	Etylacetat
H	Hydrogen
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IC <sub>50</sub>	Konsentrasjonen som gir 50 % radikalscavenging eller 50 % hemming
INRSP	Institut National de Recherche en Santé Publique
ITM	Improved Traditional Medicines
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenfosfat
Kons.	Konsentrasjon
LLE	Liquid-Liquid Extraction
MeOH	Metanol
MS	Massespektrometri
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenfosfat
NMR	Nukleær Magnetisk Resonans
NOS	Reaktive Nitrogen Species
ppm	parts per million
ROS	Reaktive Oksygen Species
RP	Reverse Phase
RSS	Reaktive svovel species
SD	Standardavvik
Si-OH	Silanol
TFA	Trifluoreddiksyre
TMS	Tetrametylsilan
TLC	Thin Layer Chromatography
UV	Ultrafiolett
XO	Xantin oksidase
WHO	World Health Organization

### **3. Hensikt med oppgaven**

Hensikten med oppgaven var å isolere og identifisere biologisk aktive lavmolekylære innholdsstoffer i den maliske planten *Biophytum petersianum*, ved å anvende metoder som analytisk og preparativ kromatografi og spektroskopi. Den biologiske effekten av planteekstrakter og isolerte renstoffer skulle studeres i utvalgte bioaktivitetstester. I tillegg skulle det samles inn informasjon om medisinsk bruk av planten ved å intervjuere healere under feltarbeid i Mali. Dette gjøres for å få økt kunnskap om tradisjonell bruk av planten.

## 4. Bakgrunn

### 4.1 *Biophytum petersianum* Klotzsch

#### 4.1.1 Taksonomisk klassifisering

(Global biodiversity information facility, 2011; ITIS Report, 2011)

Rike:	Plantae
Divisjon:	Magnoliophyta
Klasse:	Magnoliopsida
Underklasse:	Rosidae
Orden:	Geraniales
Familie:	Oxalidaceae, gaukesyrefamilien
Slekt:	<i>Biophytum</i>
Art:	<i>Biophytum petersianum</i> Klotzsch

Synonymt navn: *Biophytum umbraculum* Welwitsch (Lourteig, 1981).

#### 4.1.2 Botanikk

Slekten *Biophytum* består av rundt 50 arter av ettårige og flerårige planter fra familien Oxalidaceae.

*Biophytum petersianum* er en tynn ettårig plante som kan bli opptil 25 cm lang. Den har gule små blomster. Bladene vokser ut fra en terminal krone, og er veldig sensitive. De folder seg sammen etter været eller ved berøring. *B. petersianum* er å finne fra Senegal til Vest-Kamerun, er utbredt i tropiske og subtropiske området i Afrika, og over Asia til New Guinea. Planten kan vokse på tørr og sandete jord (Burkill, 1997).



Figur 1-4: Bilder av *B. petersianum* (Prelude medicinal plants database, 2011).

#### 4.1.3 Tradisjonell bruk

*B. petersianum* har flere ulike anvendelsesområder. De sensitive bladene har resultert i svært fantasifull folkløse, og har i Kongo blitt brukt i trolldom for å påvirke en rettssak. I Nigeria har det blitt registrert tyver som bruker planten for å indusere dyp søvn hos sine ofre, og i andre afrikanske land har den blant annet blitt brukt i seremonier for å fremkalle regn (Burkill, 1997).

Som medisinplate har *B. petersianum* et svært bredt bruksområde, særlig i Mali og andre afrikanske land. Tidligere har det blitt utført tre etnofarmakologiske studier i Mali som viser hyppig bruk av planten, tørr eller fersk, mot cerebral malaria, magesmerter og sårheling (Diallo et al., 2002; Grønhaug et al., 2008; Inngjerdingen et al., 2006).

Planten har medisinsk bruk i Elfenbenskysten ved at saft fra planten blandet med sitronsaff blir påført sår. I Nigeria brukes *B. petersianum* ved magesmerter. Pulverisert frø blandet med ”sheabutter” (fett fra *Butyrospermum parkii* (syn. *Vitellaria paradoxa*)) blir påført sår, og dekokt av røttene brukes mot gonorrhoea og nyrestein. Røttene og frøene av planten blir i Gabon betraktet som lakserende, og i Zaire blir dekokt av røttene gitt til barn mot samme

lidelse. Ved å vaske hodet i vann som planten har ligget i mener man i Ubangi at det vil hjelpe mot migrene, og de mener asken av planten blandet med olje vil lette pusteproblemer hos barn hvis blandingen smøres på barnets bryst. I Vest- Kamerun brukes planten for å lindre skorpionstikk, og i Mosambik brukes den som en antidot mot slangebitt (Burkill, 1997). Andre anvendelsesområder i Øst-Afrika er å vaske barn med maserasjon av planten ved feber, og bruk av bladene i behandling av øyesykdommer (Kokwaro, 1993). Dekokt av hele planten har blitt brukt i Togo til behandling av hypertensjon (Mouzou et al., 2010).

#### 4.1.4 Tidligere studier

Det er tidligere blitt gjort få studier på *B. petersianum*. Bioaktive polysakkarider har blitt undersøkt i ulike ekstrakter av planten, der vannekstrakt har vist å inneholde polysakkarider med doseavhengig komplementfikserende aktivitet. Siden komplementsystemet er forbundet med en sårhelende prosess, stemmer dette godt overens med den tradisjonelle bruken av planten på sår (Inngjerdingen et al., 2006). Peptin-type polysakkarider isolert fra *B. petersianum* har også vist å indusere dendritiske celler og makrofagresponsen. Disse er viktige i immunresponsen mot infeksjoner som for eksempel kan følge med et sår (Inngjerdingen et al., 2008).

Det har blitt rapportert at *B. petersianum* har en hypoglykemisk og hypotensiv virkning på gnagere. Studien demonstrerte at et hydroetanolisk ekstrakt av *B. petersianum* stimulerte kortikosteroid- og aldosteronsekresjonen i rotte der kjertler i binyrebarken ble perfundert med ekstraktet (Kodjo et al., 2006). Samme ekstrakt ble undersøkt på normale Wistar rotter for å undersøke den hypotensive effekten. Resultatene fra denne studien viste at den hypotensive effekten av ekstraktet ikke var et resultat av hemming av det sympatiske nervesystem, men delvis involverte stimulering av det parasympatiske system (Titrikou et al., 2008). En annen studie undersøkte dekokt av hele planten av *B. petersianum* for mulig påvirkning av kalsiummobilisering fra sarkoplasmatiske retikulum i skjelettmuskelceller. Resultatet viste at dekoktet hadde en signifikant antagonistisk effekt på koffeinindusert kalsiumfrigjøring fra sarkoplasmatiske retikulum (Mouzou et al., 2010). En annen studie hevder den hypotensive effekten av planten skyldes hemming av kalsiuminnstrømming både via spenning- og reseptoropererte kalsiumkanaler (Titrikou et al., 2007). Disse resultatene kan bidra til å forklare den tradisjonelle bruken av *B. petersianum* i behandlingen av hypertensjon.



To studier utført på *B. petersianum* påstår at tanniner og saponiner fra planten gjør at den kan brukes som fôr supplement hos drøvtyggere fordi den reduserer CH<sub>4</sub>-produksjonen, ammoniakkonsentrasjonen og utskillelse av nitrogen i urinen. Dette gjør at dyrets yteevne forbedres og har også en positiv effekt på miljøet (Hariadi og Santoso, 2009; Santoso et al., 2007).

## 4.2 Antioksidanter og frie radikaler

### 4.2.1 Antioksidanter

En antioksidant er enhver substans som ved lave konsentrasjoner sammenlignet med et oksiderbart stoff, signifikant hindrer eller forsinker oksidering av dette stoffet (Halliwell, 2005). Antioksidanter i kosten er for eksempel vitamin C, vitamin E og flavonoider. Naturlige antioksidanter i kroppen er superoksid dismutase (SOD), katalase og glutathion peroxidase.

### 4.2.2 Frie radikaler

Et fritt radikal er et atom eller radikal som har ett eller flere uparede elektroner. De er ofte ustabile og reagerer med andre molekyler. Eksempler på frie radikaler i kroppen er superoksid, hydroksyl- og peroksyldradikal. Disse stoffene, sammen med en del reaktive ikke-radikaler, for eksempel singlett oksygen, kalles også for reaktive oksygen species (ROS). I tillegg finnes reaktive nitrogen species (RNS), reaktive svovel species (RSS) og reaktive halogen species.

Frie radikaler dannes konstant i kroppen og finner sted i mitokondrier, lysosomer, cellemembraner, endoplasmatisk retikulum og cytosol. I tillegg til at de kan være skadelige for viktige strukturelle eller funksjonelle komponenter, er de også viktige signalmolekyler og har betydning i kroppens forsvar mot blant annet bakterielle infeksjoner. Mange sykdommer, røyking, alkohol, miljøgifter, legemidler og stråling fremmer også dannelsen av disse stoffene (Bjørneboe et al., 2007).

### **4.2.3 Oksidativt stress og antioksidantforsvar**

Oksidativt stress oppstår når det er en ubalanse mellom produksjon av reaktive species og antioksidantforsvaret i favør av ROS. Dette kan skyldes lavt nivå av antioksidanter eller en økt produksjon av ROS (Gutteridge og Halliwell, 1994).

Normalt vil det være en balanse mellom ROS og antioksidantforsvaret. De fleste celler i kroppen kan tolerere en mild grad av oksidativt stress. Ved slike tilfeller vil cellene gjenopprette balansen ved å oppregulere syntesen av antioksidantforsvarssystemet. Når det er en alvorlig grad av oksidativt stress kan det føre til alvorlige forstyrrelser i cellemetabolismen. Eksempler på dette kan være DNA- eller RNA-skade, økning i intracellulært kalsium, skade på ionetransportører og spesifikke proteiner og lipidperoksidering. Dette kan videre resultere i celledød (Gutteridge og Halliwell, 1994).

Kroppens antioksidantforsvar fjerner frie radikaler via enzymatiske og ikke-enzymatiske reaksjoner, ved å scavenge og minimalisere dannelsen av frie radikaler, reparere oksidative skader eller kompleksbinde metallioner som katalyserer autooksidasjonsreaksjoner (Halliwell, 2005).

## **4.3 Arakidonsyremetabolisme og 15-Lipoksygenase**

### **4.3.1 Arakidonsyremetabolisme**

Arakidonsyre er en umettet  $\omega$ -6 fettsyre på 20 karbonatomer med fire dobbeltbindinger som er biosyntetisk forløper til eikosanoidene. I de fleste celletyper er arakidonsyre bundet til fosfolipider i cellemembranen. Ved inflammatoriske stimuli kan enzymer som fosfolipase A2 aktiveres og frigjøre arakidonsyre fra fosfolipidene. Via en rekke ulike enzymer vil fritt arakidonsyre omdannes til eikosanoider, som har en rekke biologiske effekter på ulike celletyper. Cyklooksygenase-1 og -2 (COX) katalyserer dannelsen av prostaglandiner, prostacyclin og tromboksaner, mens lipoksygenaser (5-LO, 12-LO eller 15-LO) syntetiserer leukotriener, lipoksiner og andre forbindelser (Rang et al., 2007).

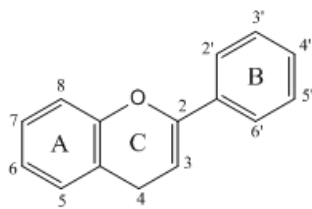
### 4.3.2 15-Lipoksygenase

15-Lipoksygenase (15-LO) danner ved reaksjon med arakidonsyre 15-HPETE, som videre omdannes til lipoksiner ved hjelp av 5-LO. 15-LO antas å spille en rolle i flere patologiske tilstander. Studier har vist at 15-LO reagerer med fettsyrer og danner aktive lipidmetabolitter som er involvert i diabetes, kardiovaskulær sykdom, hypertensjon og nyresykdom, samt neurologiske tilstander som Alzheimers sykdom (Dobrian et al., 2010). 15-LO er også vist å spille en rolle i oksideringen av "low density lipoprotein" (LDL), og oksideringsprosessen i LDL er vist å være et viktig trinn i utviklingen av aterosklerose. I tillegg hemmer 15-HPETE dannelsen av prostacyclin som virker blodåreutvidende og motvirker plateaggregering (Lyckander og Malterud, 1996; Takahashi et al., 2005).

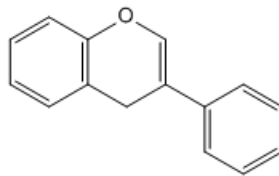
## 4.4 Flavonoider

Flavonoider er en stor klasse lavmolekylære fenoliske forbindelser som biosyntetiseres via acetat- og shikimatsporet. Grunnstrukturen består av  $C_{15}$  ( $C_6-C_3-C_6$ ), se figur 4-2. Flavonoider består av mange subklasser basert på hvordan B-ringene og C-ringene er koblet til hverandre, oksideringstilstanden og funksjonelle grupper på C-ringene (Beecher, 2003). Noen vanlige subklasser er flavoner, flavonoler, flavanoner, flavanonoler, anthocyaniner, isoflavonoider og neoflavonoider. Noen strukturer er vist i figur 4-2 (Aron og Kennedy, 2008).

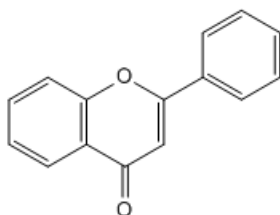
Flavonoider finnes i nesten alle planters blader, frø, bark og blomster, der de blant annet beskytter plantene mot ultrafiolett stråling, patogener og planteetere. Anthocyaniner i blomster tiltrekker pollinerende insekter, og gir karakteristiske røde og blå farger til bær, noen grønnsaker og blomster (Heim et al., 2002). Det er identifisert 8150 flavonoider totalt (Andersen og Markham, 2006). De fleste flavonoidene er tilstede i naturen som glykosider og andre konjugater. I kosten er det blitt identifisert over 4000 ulike flavonoider, hovedsakelig i epler, løk, morbær, blåbær, røde frukter, sitrusfrukter, te, rødvin, sjokolade, nøtter, kaffe og øl. Daglig inntak av flavonoider varierer vesentlig blant ulike geografiske områder og kulturer (3-70 mg) (Heim et al., 2002; Mladenka et al., 2010).



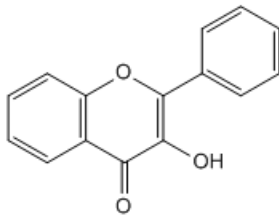
Grunnstruktur flavonoid



Isoflavonoid



Flavon



Flavonol

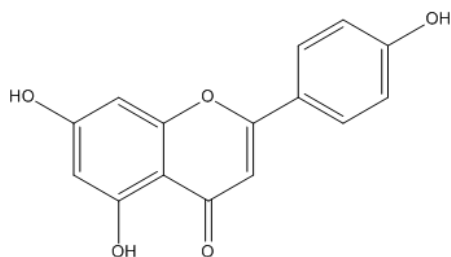
Figur 4-2: Grunnstrukturen til flavonoider og noen subklasser.

Flavonoider har mange potensielle biologiske effekter. De kan muligens beskytte mot kardiovaskulære sykdommer ved mekanismer som inkluderer antioksidant-, antiplate- og anti-inflammatoriske effekter i tillegg til å øke HDL og forbedre endotelfunksjonen. LDL oksidering er sentral i patogenesisen av aterosklerose. Flavonoider hemmer LDL oksidering, og noen studier har også vist at flavonoider minker lipidperoksidering av biologiske membraner (García-Lafuente et al., 2009).

Studier gjort på flavonoiders antioksidanteffekt viser at de har en direkte scavengeraktivitet på ROS og kan chelatere metallioner. De virker også direkte hemmende på noen radikal-dannende enzymer (xantin oksidase, NADPH oksidase og lipoksygenase), reduserer plateaggregering og leukocyt adheksjon og har vasodilaterende egenskaper. Hvilke flavonoid som har hvilke av de nevnte effektene avhenger av deres struktur. For eksempel er to hydroksylgrupper på B-ring (katekol B-ring) vanligvis nødvendig for god scavengeraktivitet (Mladenka et al., 2010).

#### 4.4.1 Apigenin

Apigenin (5,7,4'-trihydroksyflavon) er et flavon som det finnes mye av i vanlige frukter som appelsin og grapefrukt, i grønnsaker som persille og løk, i drikker som te, øl og rødvin, og i hvete og krydder. I naturlige kilder finnes apigenin som apigenin-7-O-glukosid og forskjellige acylerte derivater (Shukla og Gupta, 2010). Apigenin finnes i en rekke medisinsplanter. Et eksempel er blomsten kamille (*Matricaria recutita* L) (McKay og Blumberg, 2006).



Figur 4-3: Struktur av apigenin.

I de senere årene har apigenin fått stor interesse på grunn av dens lave toksisitet, og slående effekter på kreftceller i forhold til normale celler, sammenlignet med andre struktur-relaterte flavonoider. Apigenin blir derfor sett på som et kreftforebyggende stoff, og mulige kreftforebyggende effekter kan skyldes dets potente antioksidant- og anti-inflammatoriske aktiviteter. I tillegg er det vist at apigenin fører til bedre kardiovaskulære forhold og stimulerer immunsystemet (Shukla og Gupta, 2010).

## 5. Eksperimentelt

### 5.1 Materialer

#### 5.1.1 Kjemikalier

Kjemikalier	Produsent
Aceton purum	Chemi-Teknik AS, Oslo, Norge
Acetonitril	Merck, Darmstadt, Tyskland
1-Butanol	Merck, Darmstadt, Tyskland
Ceric (1 % ceriumsulfat i 10 % vandig svovelsyre)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Destillert vann	Farmasøytisk institutt, Oslo, Norge
Difenylpicrylhydrazyl (DPPH)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dimetylsulfoksid (DMSO)	Merck, Darmstadt, Tyskland
d-Kloroform (CDCl <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
d-Metanol (CD <sub>3</sub> OD)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Eddiksyre	VWR International, Oslo, Norge
Etylacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Hypoxantin (6-hydroxypurin)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Linolsyre	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Lipoxidase type 1-B fra soyabønne	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Metanol Cromosolv	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Metanol purum	Chemi-Teknik AS, Oslo, Norge
N <sub>2</sub> -gass	AGA, Oslo, Norge
Quercetin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tetrametylsilan (TMS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Trifluoreddiksyre (TFA)	Merck, Hohenbrunn, Tyskland
Tungtvann (D <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Xanthin oxidase fra kumelk	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

### 5.1.2 Apparatatur

<b>Apparatatur</b>	<b>Produsent</b>
<b>Analytisk tynnsjikt-skromatografi (TLC)</b>	
Silika gel 60 F <sub>254</sub> , aluminiumsplater	Merck, Darmstadt, Tyskland
Silika gel RP-18 F <sub>254</sub> , aluminiumsplater	Merck, Darmstadt, Tyskland
HPTLC-fertigplatten RP-18 WF <sub>254s</sub>	Merck, Darmstadt, Tyskland
End-to-end pipetter, 10 µl	Vitrex Medicinal AS, Hestev, Danmark
Elueringskar, glass	Camag, Muttenz, Sveits
TLC-sprayer	Merck, Darmstadt, Tyskland
<b>Automatpipetter</b>	
Finnpipette	Labsystems, Helsinki, Finland
Multipipette	Pipetman Gilson, Frankrike
Eppendorf pipette	Eppendorf, Hamburg, Tyskland
<b>Filter</b>	
Whatman IPS, silicone treated, 15,0 cm	Whatman, Maidstone, England
Schleicher & Schuell Rundfilter 150 mm	Schleicher & Schuell, Dassel, Tyskland
HPLC-filter, 3 mm, 0,45 µm aero LC	Chiron Laboratories AS, Trondheim, Norge
Millex millipore	Millipore, MA, USA
<b>Analytisk HPLC</b>	
Hitachi Elite Labchrom Organizer	Hitachi, Tokyo, Japan
Hitachi Elite Labchrom Column oven L-2300	Hitachi, Tokyo, Japan
Hitachi Elite Labchrom Autosampler L-2200	Hitachi, Tokyo, Japan
Hitachi Elite Labchrom Pump L-2130	Hitachi, Tokyo, Japan
Hitachi Elite Labchrom Diode Array Detector L-2455	Hitachi, Tokyo, Japan
Chromolith Guard Column RP-18e 5-4,6 mm	Merck, Darmstadt, Tyskland
Chromolith Performance RP-18e 100-4,6 mm	Merck, Darmstadt, Tyskland
Varian 100-5 C18 250 x 4,6 mm	Varian, Walnut Creek, CA, USA
<b>Preparativ HPLC</b>	
Varian prostar detector	Varian, Walnut Creek, CA, USA
Varian prostar pumpe A model 210	Varian, Walnut Creek, CA, USA
Varian prostar pumpe B model 210	Varian, Walnut Creek, CA, USA

Varian dynamax C18 250 x 21,4 mm	Varian, Walnut Creek, CA, USA
Semipreparativ kolonne: LiChrocart LiChrospher 100 RP-18e 250 x 10 mm	Merck, Darmstadt, Tyskland
<b>Kolonnekromatografi</b>	
Versaflash kolonneholder	Supelco, Bellefonte, PA, USA
Büchi 681 kromatografpumpe	Büchi, Flawil, Sveits
Versapak C18-kolonne 40 x 150 mm	Supelco, Bellefonte, PA, USA
Versapak C18-kolonne 40 x 75 mm	Supelco, Bellefonte, PA, USA
Sephadex LH20	Pharmacia Biotech, Uppsala, Sverige
<b>Magnetrorer</b>	
IKA Combimag RCO	Janke & Kunkel, Staufen, Tyskland
<b>NMR</b>	
Bruker DPX 300	Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Tyskland
Bruker AVII 600	Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Tyskland
<b>Oljepumpe</b>	
Edwards model E-Lab 2	Edwards High Vacuum Int., Sussex, England
<b>Rotavapor</b>	
IKA RV 10 basic	IKA, Janke & Kunkel, Staufen, Tyskland
Vannbad: IKS HB 10 basic	IKA, Janke & Kunkel, Staufen, Tyskland
<b>Ultralydbad</b>	
Bransonic 220	Branson Ultrasonics Corp., Geneve, Sveits
<b>UV-spektroskopi</b>	
Biochrom Libra S32PC	Biochrom, Cambridge, England
UV-lampe: Model UVGL-58 (254 og 365 nm)	Ultra Violet Products, Upland, CA, USA
Kvartskyvetter	Starna, Essex, England
<b>Varmeskap</b>	
Thermo scientific Heraeus oven	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Tyskland
<b>Vekt</b>	
Sartorius ED224S	Sartorius, Göttingen, Tyskland
Mettler Toledo PB3002	Mettler, Nänikon, Sveits



## 5.2 Metoder

Separasjonsmetodene som ble benyttet er basert på tidligere erfaringer når det gjelder separering av lavmolekylære stoffer fra planter, og målet om å isolere og identifisere antioksidanter fra *B. petersianum*. Ekstraksjon ble først benyttet for å oppnå en grovseparasjon basert på lipofilisitet. Kolonnekromatografi ble deretter benyttet for å fraksjonere stoffet, og det ble utført analytisk tynnsjiktskromatografi (TLC) etterfulgt av ceric og/eller DPPH-spraying for å finne ut hvilke fraksjoner som var like nok til å kunne slås sammen. Sammenslåtte fraksjoner ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljevakuumpumpe. Fraksjonene ble deretter veid, og  $^1\text{H}$ -NMR-spektre ble tatt opp for alle fraksjonene. For interessante spektra ble  $^{13}\text{C}$ -NMR-spektroskopi også utført. Den biologiske aktiviteten til stoffene ble testet ved undersøkelse av DPPH-scavenging, 15-LO-hemming og xantine oksidase-hemming. Fraksjoner med interessante NMR-spektra, høy vekt og høy biologisk aktivitet ble ytterligere fraksjonert ved bruk av kolonnekromatografi eller preparativ høytrykksvæskeskromatografi (HPLC) med formål om å isolere lavmolekylære innholdsstoffer med biologisk aktivitet.

### 5.2.1 Generelle metoder

#### 5.2.1.1 Vannkvalitet

Det ble brukt destillert vann ved alle metoder.

#### 5.2.1.2 Innveeing

Analysevekt ble brukt ved totalvekt under 220 g og overskålsvekt ble brukt ved totalvekt over 220 g.

#### 5.2.1.3 Inndamping

##### *Prinsipp*

Etter ekstraksjon eller kromatografi, ble rotavapor benyttet for å fjerne løsningsmidlet. Når prøvene var tørre, ble de enten plassert i avtrekksskap til neste dag eller satt på oljepumpe for å fjerne alle løsningsmiddelrester.

### *Utstyr*

Rotavapor med vakuumpumpe og vannbad

Oljepumpe

### *Utførelse*

Løsninger ble dampet inn på rotavapor ved 40-60 °C under vakuum.

## **5.2.1.4 Filtrering**

Alle prøvene ble filtrert før de ble satt på de ulike kromatografiapparatene. Det ble brukt filterpapir, sprøyte-drevet filter eller glassinterfilter avhengig av hvilken separasjonsmetode som ble benyttet.

## **5.2.2 Separasjonsmetoder**

### **5.2.2.1 Væske-væske ekstraksjon**

#### *Prinsipp*

Ved væske-væske ekstraksjon (LLE) bringes to ikke blandbare væsker i kontakt med hverandre slik at et stoff som er løst i den ene væsken, diffunderer over i den andre, der stoffet er mer løselig. Den ene væsken er en vandig løsning og den andre væsken er et organisk løsemiddel som ikke er blandbart med vann (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen, 2004).

#### *Reagenser og utstyr*

Destillert vann

Etylacetat

1-Butanol

Skilletrakt

Stativ

Begerglass

Filterpapir

#### *Prosedyre*

Se væske-væske ekstraksjon kap 5.3.2.

### 5.2.2.2 Versaflash kolonneseparasjon

#### *Prinsipp*

Kolonnekromatografi er en separasjonsmetode hvor mobilfasen er en væske og stasjonærfasen består av faste partikler pakket i en kolonne. Kolonnen er montert på et stativ som er koblet til en pumpe. Pumpen driver mobilfasen gjennom kolonnen med en bestemt hastighet. Prøven som er i væskeform kan enten injiseres direkte øverst i kolonnen eller suges opp samme vei som mobilfasen. De ulike forbindelsene i prøven vil vandre nedover kolonnen med forskjellig hastighet på grunn av ulik interaksjon med kolonnematerialet, og vil komme ut av kolonnen på forskjellige tidspunkter. Dermed separeres stoffene i prøven. I versaflash kolonneseparasjon benytter man seg av ferdig pakkede VersaPak kolonner, med polar eller upolar stasjonærfase.

#### Kolonnemateriale

- Normalfase-silika

I normalfasekromatografi er silika, eller silikagel, den viktigste stasjonærfasen. Silika består av et porøst materiale og har derfor et stort overflateareal. Når mobilfase strømmer gjennom silika, vil den fylle opp hele volumet mellom partiklene og hele porevolumet inni partiklene. Dette gir en meget stor kontaktflate til mobilfasen. Stoffmolekyler som transporteres av mobilfasen, vil eksponeres kraftig for de aktive silanolgruppene (Si-OH) på overflaten. Det er disse gruppene som gjør overflaten polar og svakt sur. En blanding av stoffer separeres etter hvor kraftig interaksjonen med silanolgruppene på silika er. Hydrogenbindingsinteraksjonene er de kraftigste interaksjonene, og dipolinteraksjoner er sterkere enn dispersjonsinteraksjoner. Mettede hydrokarboner har ingen interaksjon med silika og blir derfor ikke retardert. I normalfasekromatografi er mobilfasene organiske løsemidler (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen, 2004).

- Omvendtfase silika

I omvendtfase-kromatografi er stasjonærfasen hydrofob. Dette er vanligvis fremstilt ved å binde hydrofobe grupper til silanolgruppene på silika ved å bruke klorsilaner som reagenser. C<sub>18</sub>-materialet som har en hydrokarbonkjede med 18 karbonatomer er mest brukt i omvendt-fase kromatografi. De viktigste interaksjonene som finner sted mellom forbindelsene i prøven og stasjonærfasen er av typen van der Waals-krefter, relativt svake krefter som øker med molekylstørrelsen. De polare funksjonelle gruppene i et stoff gir svakest interaksjon med stasjonærfasen, og dermed vil de mest polare komponentene elueres ut først. Elueringsmidlet er typisk en blanding av vann og en organisk modifikator

som er blandbar med vann, som for eksempel metanol (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen, 2004).

#### *Reagenser og utstyr*

Destillert vann

Metanol

Aceton

Versaflash-apparat med tilhørende utstyr

Versapak C<sub>18</sub>-kolonne

Dramsglass (lite prøveglass, 10-60 ml)

Begerglass

#### *Prosedyre*

1. Kolonnen kondisjoneres med ca. 3 kolonnevolum av starteluenten.
2. Prøven løses i et lite volum av egnet løsningsmiddel og filtreres for å fjerne partikler.
3. Prøven appliseres på kolonnen.
4. Komponenter elueres ut ved hjelp av egnede elueringsmidler, og fraksjoner (10-60 ml) samles opp.
5. Til slutt vaskes kolonnen med et egnet løsningsmiddel for å skylle ut eventuelle rester.

### **5.2.2.3 Sephadex kolonne-separasjon**

#### *Prinsipp*

Prinsippet for Sephadex er ganske likt som for versaflash kolonnekromatografi. Kolonnen inneholder en finfordelt stasjonær fase. Når en prøve appliseres på kolonnen og elueres med et passende elueringsmiddel, vil de ulike forbindelsene i prøven vandre nedover kolonnen med forskjellig hastighet på grunn av ulik grad av interaksjon med kolonnematerialet, og dermed kan stoffene separeres.

#### **Sephadex LH-20**

Sephadex LH-20 består av hydroksypropylert Sephadex G-25, og er en dekstrangel som lages ved kryssbinding av dekstrankjeder. Dette gir et tre-dimensjonalt polysakkarid nettverk.

Hydroksypropylgruppene er bundet til glukoseenheterne i dekstrankjeden med eterbindinger.

Dette gir gelen både lipofile og hydrofile egenskaper. Prinsippet for separasjon med Sephadex

LH-20 er eksklusjonskromatografi (Grønhaug, 2006). Dette betyr at stoffer i løsning separeres etter deres molekylstørrelse, forutsatt at det ikke er interaksjon mellom stoffene og stasjonærfasen. Stasjonærfasen består av porøse partikler med kontrollert porestørrelse. Når stoffene transporteres gjennom kolonnen, vil stoffmolekyler som er små gå inn i porene i pakkematerialet og få en lang vei gjennom kolonnen, mens de som er for store til å gå inn i porene, vil forbli utenfor porene. Disse store molekylene blir transportert gjennom kolonnen på utsiden av partiklene, med samme hastighet som mobilfasen. De største molekylene får altså kortest retensjon, og retensjonen øker etter som molekylene blir mindre og penetrerer lettere inn i porene (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen, 2004). Adsorpsjon spiller i tillegg til eksklusjon en viktig rolle fordi Sephadex LH-20 har sterkt adsorptive egenskaper ovenfor aromatiske forbindelser. Disse egenskapene varierer med ulike eluenter (Grønhaug, 2006).

### *Reagenser og utstyr*

Destillert vann

Metanol

Aceton

Sephadex LH-20 gel

Kolonne (indre diameter: 3 cm, høyde: 20 cm)

Stativ

Dramsglass

Begerglass

### *Prosedyre*

1. Kolonne med forhåndssvellet kolonnematriks monteres vertikalt på stativ.
2. Kolonnen kondisjoneres med ca. 2 kolonnevolum av starteluenten.
3. Prøven løses i et lite volum av egnet løsningsmiddel og filtreres for å fjerne partikler som potensielt kan tilstoppe kolonnen.
4. Prøven appliseres langs veggen på kolonnen slik at den legger seg jevnt og ikke virvler opp pakkematerialet.
5. Komponenter elueres ut ved hjelp av egnede elueringsmidler, og fraksjoner (10-60 ml) samles opp.
6. Til slutt vaskes kolonnen med et egnet løsningsmiddel for å skylle ut eventuelle rester.

#### 5.2.2.4 Preparativ HPLC

##### *Prinsipp*

Prinsippet for høytrykksvæskekromatografi (HPLC) er relativt likt som for versaflash kolonnekromatografi. Metoden baserer seg på at mobilfase som er en væske, presses gjennom en kolonne, vanligvis 10-25 cm lang, pakket med et materiale som retarderer stoffene i prøveløsningen. HPLC er forskjellig fra versaflash kolonnekromatografi ved at pumpene som brukes må være i stand til å pumpe væske med konstant hastighet mot et høyt trykk. Grunnen til dette er fordi kolonnen er pakket med små, runde og like store partikler for å gi en god separasjon, men dette vil da føre til et mottrykk på 30-300 bar når mobilfasen pumpes gjennom. I tillegg er det koblet til en detektor (vanligvis UV-detektor) som gir en elektronisk respons for stoffene (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen, 2004). Ut fra denne detektorresponsen som vises underveis i kjøringen kan prøven deles opp i mindre fraksjoner.

Det finnes mange ulike kolonnematerialer til bruk ved HPLC, som blant annet normalfase silika og omvendt-fase C<sub>2</sub>-, C<sub>8</sub>- og C<sub>18</sub>-bundet silika. HPLC kan brukes både analytisk og preparativt. Analytiske HPLC-kolonner er mindre enn preparative kolonner, og kromatogrammet kan blant annet brukes for å se hvor rent et stoff eller hvor komplisert en stoffblanding er, samt kvantifisering av kjemiske komponenter. Analytisk HPLC blir også brukt til å finne en egnet mobilfase til preparativ kjøring, og det er kun et lite uttak av prøven som blir analysert.

##### *Reagenser og utstyr*

Destillert vann

Metanol med 0,1 % TFA

Acetonitril med 0,1 % TFA

HPLC-apparat med tilhørende utstyr

Sprøytetrevet filter

Dramsglass

##### *Prosedyre for preparativ HPLC*

1. Kolonnen kondisjoneres med starteluenten i 30 minutter.
2. Prøve løses i egnet løsningsmiddel og filtreres gjennom et sprøyte-drevet filter for å fjerne partikler som potensielt kan tilstoppe kolonnen.
3. 1-1,5 ml av prøveløsningen injisert via injeksjonsloopen.

4. Det benyttes gradienteluering siden stoffer med stor forskjell i retensjon skal separeres. UV-detektoren som kalles diodearraydetektor brukes, og bølgelenger i område 280 nm og 340 nm er særlig interessante da signaler fra aromatiske forbindelser som flavonoider/kumariner ofte dukker opp i disse områdene.
5. Fraksjoner samles opp i dramsglass etter detektorresponsen.
6. Til slutt vaskes kolonnen med et egnet løsningsmiddel for å skylle ut eventuelle rester. Injeksjonsloopen vaskes også ved å injisere metanol et par ganger.

### **5.2.3 Identifikasjonsmetoder**

#### **5.2.3.1 Analytisk HPLC**

##### *Prinsipp*

Se prinsipp kap 5.2.2.4.

##### *Reagenser og utstyr*

Se reagenser og utstyr kap 5.2.2.4.

##### *Prosedyre for analytisk HPLC*

1. Kolonnen kondisjoneres med starteluenter i 30 minutter.
2. Litt av prøven løses i egnet løsningsmiddel til en konsentrasjon på ca. 0,5 mg/ml, og filtreres gjennom et sprøyte-drevet filter for å fjerne partikler som potensielt kan tilstoppe kolonnen.
3. 0,5-1 ml av prøveløsningen overføres til vial og settes i HPLC-apparatet.
4. Det benyttes gradienteluering siden stoffer med stor forskjell i retensjon skal separeres. UV-detektoren som kalles diodearraydetektor brukes, og bølgelenger i område 280 nm og 340 nm er særlig interessante da signaler fra aromatiske forbindelser som flavonoider/kumariner ofte dukker opp i disse områdene.
5. Til slutt vaskes kolonnen med et egnet løsningsmiddel for å skylle ut eventuelle rester.

#### **5.2.3.2 Analytisk tynnsjikt-kromatografi (TLC)**

##### *Prinsipp*

Tynnsjikt-kromatografi (TLC) er en væske-kromatografisk separasjonsmetode hvor stasjonær fasen er spredt som et tynt sjikt utover en plate av glass, plast eller metall. Plater for

normalfasekromatografi er belagt med silika, mens plater for omvendtfase-kromatografi er belagt med silanisert silika. Sjøktet kan også være tilblandet fluorescensindikatorer som letter påvisningen av stoffene på platen. Prøvene som er løst i et flyktig løsningsmiddel, settes som flekker på platen parallelt med den ene kanten. Løsningsmidlet fordampes og platen settes i et kar med mobilfase i bunnen av karet. Karet lukkes og mobilfasen vil migrere oppover platen ved hjelp av kapillærkrefter. Hvor fort stoffene vandrer oppover platen er avhengig av deres fordeling mellom mobilfasen og stasjonærfasen. Når mobilfasen nærmer seg den øverste kanten av platen, tas platen ut av karet, væskefronten merkes og mobilfasen dampes av. Fargede stoffer er umiddelbart synlige, mens stoffer som absorberer UV-lys eller som fluorescerer, kan påvises ved bruk av en UV-lampe (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen, 2004).

#### *Reagenser og utstyr*

Destillert vann

Metanol

Etylacetat

Eddiksyre

TLC-plate

Mikropipette 10 µl

Elueringskar med tett lokk

UV-lys

#### *Prosedyre*

1. Ønsket mobilfase lages og overføres til elueringskar med lokk.
2. TLC-platen avmerkes med blyantkryss der prøvene skal appliseres (ca. 2 cm fra den ene kanten og ca. 1 cm mellom hver prøve).
3. Mikropipetter brukes til påsetting av prøveløsning (5-10 µl).
4. Løsningsmidlet fordampes ved lufttørking, og platen settes ned i elueringskaret med prøvekannten nederst.
5. Når mobilfasen er 2-5 cm fra den øverste kanten, tas platen ut, fronten merkes og platen lufttørkes eller tørkes med hårføner.
6. TLC-platen undersøkes deretter i kortbølget (254 nm) og langbølget (366 nm) UV-lys, og flekker avmerkes på platen med blyant.
7. Platen sprayeres eventuelt med Ceric- eller DPPH-reagens.



### 5.2.3.3 DPPH-spraying

#### *Prosess*

Prinsippet for DPPH-spraying er det samme som for DPPH-testen som er beskrevet i avsnitt ”5.2.4.1 Radikalscavenging (DPPH-test)”. Ved å spraye prøver påsatt tynnsjiktplater, enten som påsatte flekker eller som utviklede prøver, vil stoffer med radikalfangende evne kunne detekteres visuelt ved at det dannes gule flekker mot lilla bakgrunn.

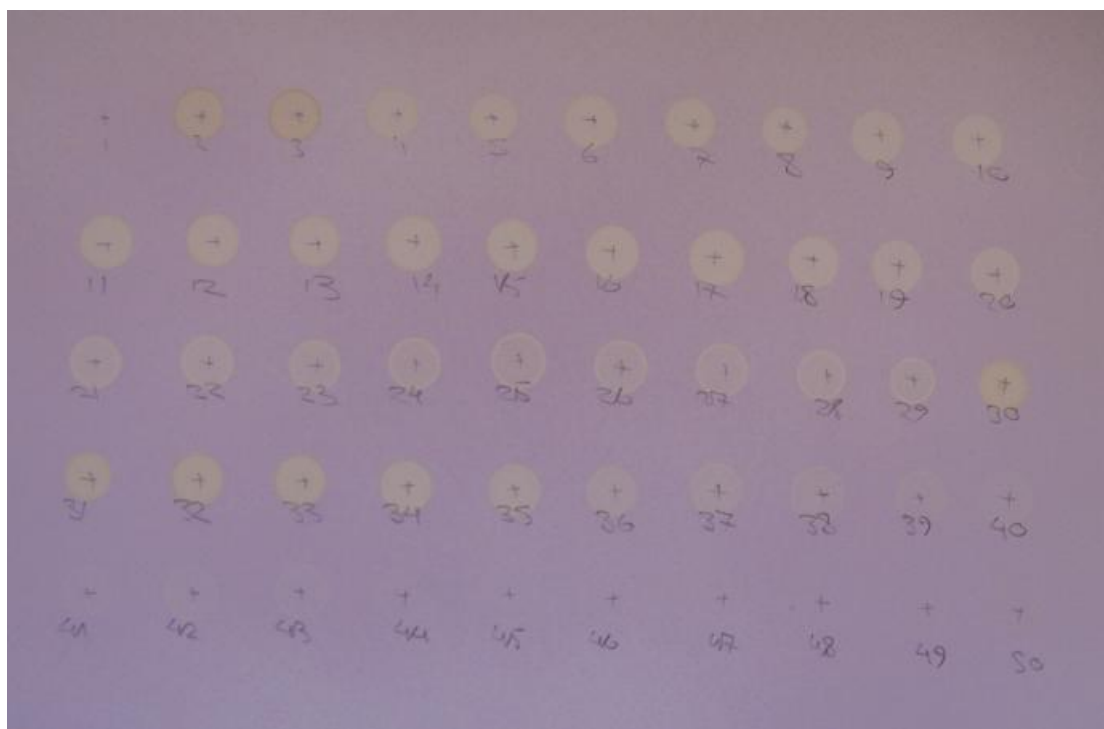
#### *Reagenser og utstyr*

DPPH løses i metanol til en konsentrasjon på ca. 0,4 mg/ml.

TLC-sprayer

#### *Prosedyre*

1. Tynnsjiktplate med påsatt prøve sprayes med DPPH-reagens.
2. Resultatet avleses visuelt etter et par minutter.



Figur 5-1: Eksempel på en TLC-plate sprayet med DPPH-løsning. De gule flekkene indikerer radikalfangende stoffer.

#### 5.2.3.4 Ceric-spraying

##### *Prinsipp*

Ceric-reagenset inneholder 1 prosent cerium(IV)sulfat løst i 10 prosent vandig svovelsyre, og vil oksidere de fleste organiske forbindelser.

##### *Reagenser og utstyr*

Ceric-reagens

Varmeskap

TLC-sprayer

##### *Prosedyre*

1. Ferdigutviklet tynnsjiktplate sprayes med Ceric-reagens etter betraktning i UV-lys og avmerking med blyant.
2. Tynnsjiktplaten legges i varmeskap i 10-15 minutter ved 100 °C.
3. Resultatet avleses deretter visuelt.

#### 5.2.3.5 NMR-spektroskopi

##### *Prinsipp*

NMR (kjernemagnetisk resonans)-spektroskopi er en spektroskopisk metode som brukes til å bestemme strukturen til en forbindelse ved å identifisere kjerner som  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  og  $^{31}\text{P}$ .

Kjerner av hydrogen ( $^1\text{H}$ ), karbon-13 ( $^{13}\text{C}$ ) og andre isotoper som er NMR-aktive oppfører seg som de var små magneter og spinner rundt sin egen akse. Ved fravær av et eksternt magnetfelt vil de magnetiske kjernene ha en tilfeldig orientert spinn. Hvis de utsettes for et eksternt magnetfelt vil de få en bestemt orientering.  $^1\text{H}$ - og  $^{13}\text{C}$ -kjerner vil da enten innrette seg med (parallelt) eller mot (antiparallelt) det eksterne magnetfeltet. Den parallelle orienteringen krever mindre energi, og favoriseres av de fleste kjerner. Dersom de parallelt orienterte kjernene blir bestrålt med elektromagnetisk stråling med korrekt frekvens, tar de opp energi og vil flippe over fra et lavere energinivå til et høyere. Når dette skjer sies det at den magnetiske kjernen er i resonans med den påførte strålingen, derav navnet kjernemagnetisk resonans. Den eksakte frekvensen som er nødvendig for å oppnå resonans er avhengig både av styrken til det eksterne magnetfeltet og kjernen (Solomons og Fryhle, 2004).

Absorpsjonsfrekvensen til  $^1\text{H}$  og  $^{13}\text{C}$  er ikke lik for alle kjernene. Grunnen til dette er at det magnetiske feltet dannes av elektroner som sirkulerer rundt kjernen, og lokale magnetiske felt dannes på grunn av elektronene andre steder i molekylet. Disse elektronene skjærmer kjernen fra full effekt av magnetfeltet. NMR-instrumentet detekterer disse forskjellene, og vil vise forskjellige signaler for alle kjerner som har ulikt elektronmiljø. NMR-spektre viser påført feltstyrke økende fra venstre mot høyre. Altså er kjerner i den venstre delen av spektret mindre skjermet (deskjermet) enn kjerner i den høyre delen av spektret, og får en høyere ppm-verdi enn kjerner til høyre i spektret. Posisjonen i NMR-spektret hvor en kerne gir et signal kalles kjemisk skift ( $\delta$ ), og har enheten parts per million (ppm). Signalet ved  $\delta$  er lik 0 ppm, og korresponderer til en standard som kalles tetrametylsilan (TMS). Denne brukes til å kalibrere kjemisk skift-skalaen (Solomons og Fryhle, 2004).

I  $^1\text{H}$  NMR spektre er arealet under signalet proporsjonalt med antallet protoner som gir opphav til signalet. Ved å integrere arealet under signalet kan man dermed regne ut det relative antallet protoner som gir opphav til de ulike signalene i spektret.

Signalene i  $^1\text{H}$ -NMR spektret kan opptre som singletter, dubletter, tripletter, doble dubletter, multipler mm. Dette kalles spin-spin-splitting og årsaken til dette er fordi de små magnetfeltene til to nabokjerner vil påvirke hverandre. Magnetisk identiske protoner kobler ikke med hverandre. For at to protoner på samme karbonatom skal koble, og signalene splittes, må de være ulike. Vanligvis vil et proton med  $n$  identiske naboprotoner gi opphav til  $(n+1)$  signaler. Denne splittingen av signaler kan gi oss verdifull informasjon om strukturen til molekylet, og antall topper i et signal gir informasjon om hvor mange protoner som er i nabostilling til et bestemt proton (Hedding, 2007). Interaksjon med protoner med nærliggende resonansfrekvens kan gi mer kompliserte oppsplittingsmønstre (høyere ordens spektre).

Hvis et signal er delt i flere topper kaller vi avstanden mellom disse toppene for koblingskonstanten,  $J$ . Koblingskonstanten måles i Hz og ligger vanligvis mellom 0-18. Signalene til kjernene som påvirker hverandre vil ha topper med lik koblingskonstant. På den måten kan man se hvilke protoner som påvirker hverandre og dermed ligger i nabostilling.

$^1\text{H}$ - og  $^{13}\text{C}$ -NMR er eksempler på endimensjonal NMR spektroskopi. Det finnes også teknikker for todimensjonal NMR, som COSY og HMBC. Noen eksempler på en- og todimensjonale NMR metoder er nevnt under:

- APT (Attached Proton Test) er en endimensjonal NMR metode som gir en indikasjon på de ulike karbonatomenes kjemiske natur ved at signalene for primære og tertiære karbonatomer peker oppover, altså gir positive signaler, mens signalene for sekundære og kvarternære karbonatomer peker nedover, gir negative signaler. Alle signalene kommer ved karbonatomenes naturlige kjemiske skift.
- DEPT135 (Distortionless Enhancement By Polarization Transfer) viser som i APT positive signaler for primære og tertiære karbonatomer, og negative signaler for sekundære karbonatomer. I DEPT135 vises ikke signaler for kvarternære karbonatomer.
- COSY (Correlation Spectroscopy) er proton-proton korrelasjonsspektroskopi og gir informasjon om hvilke protoner som kobler med hverandre uten at koblingskonstanter trenger å identifiseres.
- HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) og HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) er todimensjonale NMR metoder som baserer seg på  $^1\text{H}$  NMR og  $^{13}\text{C}$  NMR-spektret, og gir informasjon om krysskoblinger mellom C og H. Spektrene ligger på hver sin akse og vi ser krysskoblinger i spektret der hvor signaler for C og H som er bundet til hverandre møtes. Dette spektret kan brukes til å oppklare bindingsmønsteret mellom C og H i molekylet.
- HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) er en todimensjonal NMR metode som viser koblinger mellom C og H som ligger 2, 3 og (4) bindingsavstander fra hverandre.  $^1\text{H}$  NMR- og  $^{13}\text{C}$  NMR-spektret er også her på hver sin akse, og signaler opptrer i spektret der hvor signaler til C og H som kobler møtes. Denne metoden brukes også til å oppklare bindingsmønsteret i molekylet.

#### *Reagenser og utstyr*

Deuterert løsningsmiddel tilsatt 1 % TMS som referansesubstans

NMR-spektrometer

NMR-rør

Propp til NMR-rør

### *Prosedyre*

1. En liten mengde prøve (vanligvis 2-50 mg) løses i et egnet deuterert løsningsmiddel (ca. 1 ml). Det deutererte løsningsmidlet er på forhånd tilsatt omtrent 1 % TMS.
2. Ferdig oppløst prøve overføres til NMR-rør og propp settes på.
3. Prøven settes i NMR-spektrometeret som analyserer prøven

### **5.2.3.6 Massespektrometri**

#### *Prinsipp*

##### Elektronionisasjon

Massespektrometri (MS) med elektronionisasjon (EI) foregår under vakuum ved at analytten overføres inn i en stråle med elektroner som kommer fra en liten tråd av rhenium eller wolfram. Dette fører til at et elektron rives løs fra molekylet som følge av elektrisk frastøting, og det blir dannet et molekyllion ( $M^+$ ). De fleste molekyllioner er relativt ustabile, og mange av dem vil fort fragmentere og danne fragmentioner. Massespektrometeret måler størrelsen og relativ forekomst av disse fragmentene, og plotter informasjonen i form av et massespektrum. Massespektret kan brukes til å identifisere organiske forbindelser fordi forskjellige stoffer har forskjellige massespektre. En ukjent forbindelse kan dermed identifiseres dersom massespektret til stoffet stemmer overens med massespektret til en bestemt forbindelse. Det kan også benyttes til å få strukturinformasjon til ukjente stoffer ved å analysere fragmenteringsmønsteret (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen, 2004).

##### Elektrosprayionisasjon

Forbindelser som det ikke er mulig å få over i gassfase kan analyseres med elektrosprayionisasjon (ESI). Massespektrometri med ESI foregår under atmosfæretrykk ved at prøven føres inn i massespektrometeret i en væskestrøm gjennom et trangt kapillærrør. I kapillærrøret forstøves væsken ved hjelp av nitrogen slik at det dannes en sky av meget små dråper. Dette kapillæret er pålagt et elektrisk potensial på 2-5 kV som gjør at de små dråpene får elektrisk ladning. Væsken, som må være flyktig, vil etterhvert fordampe og spyles ut av massespektrometeret, mens analyttmolekylene vil beholde ladningene og dyttes inn i analysatoren ved hjelp av elektrisk spenning. ESI er en myk ioniseringsteknikk, noe som betyr at det stort sett dannes molekyllioner som ikke vil fragmentere videre (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen, 2004).

## Reagenser og utstyr

Metanol

Analysen ble utført ved Kjemisk Institutt ved Universitetet i Oslo.

## Prosedyre

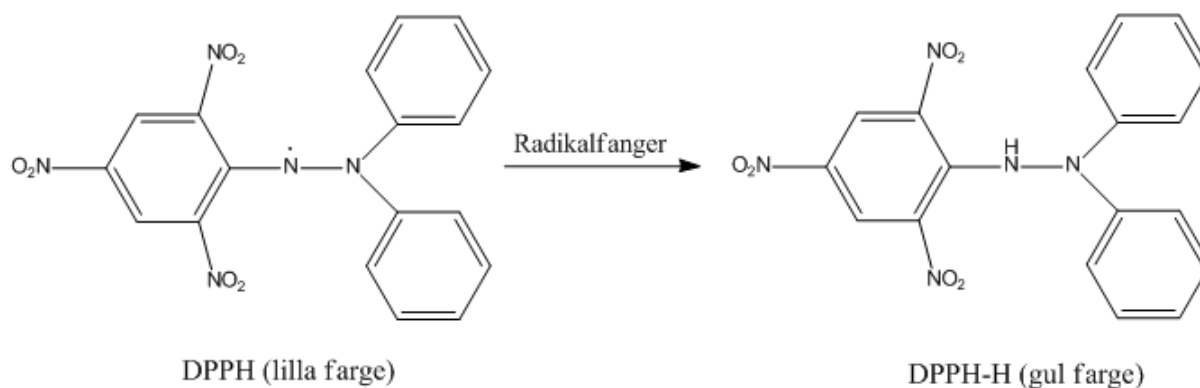
1. En liten mengde prøve (ca. 1 mg) ble løst i en liten mengde metanol og overført til et lite dramsglass.
2. Analysen ble utført ved Kjemisk Institutt ved Universitetet i Oslo.

## 5.2.4 Metode for måling av biologisk aktivitet

### 5.2.4.1 Radikalscavenging (DPPH-test)

#### Prinsipp

Det stabile radikalet  $\alpha,\alpha$ -difenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) kan brukes til å estimere radikalfanger aktiviteten til en forbindelse. DPPH har et uparet elektron som gir molekylet et sterkt absorpsjonsbånd ved 517 nm, og en mørk lilla farge i løsning. Ved reaksjon med en radikalscavenger reduseres radikalet, og løsningen vil endres til en svak gul farge. Se figur 5-2. Da vil også absorbansen ved 517 nm reduseres (Blois, 1958).



Figur 5-2: Reduksjon av DPPH ved radikalscavenging.

For å finne ut om en forbindelse er en radikalscavenger, kan absorbansen måles ved 517 nm før og etter tilsetning av prøven til DPPH. En radikalscavenger vil gi en nedgang i absorbans, og prosent radikalscavenging kan beregnes ved bruk av formelen:

$$100 \times (A_0 \times (2,95/3) - A_t) / (A_0 \times 2,95/3)$$

hvor  $A_0$  er startabsorbansen før tilsetning av prøveløsning og  $A_t$  er sluttabsorbansen etter endt måletid. Startabsorbansen multipliseres med 2,95/3 for å korrigere for fortynningen når prøveløsningen tilsettes DPPH-løsningen.

#### *Reagenser og utstyr*

Metanol

DMSO

DPPH

UV-spektrofotometer

Kvartskyvetter

Pipetter og pipettespisser

Plastspatler

#### *Prosedyre*

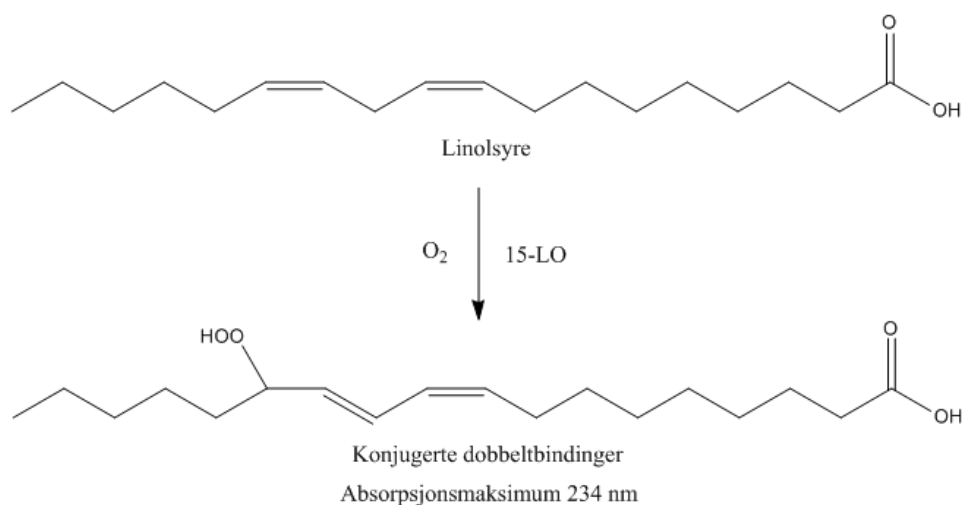
1. DPPH løses i metanol til en konsentrasjon (ca. 0,04 mg/ml) som gir en absorbans på ca. 1 ved 517 nm.
2. Prøver som skal testes løses i DMSO til ønsket startkonsentrasjon. Fortynningsrekke lages av startkonsentrasjonene.
3. Quercetin løst i DMSO brukes som positiv kontroll.
4. Spektrofotometeret nullstilles med en blindprøve med 2,95 ml metanol.
5. Absorbans måles i 2,95 ml DPPH-løsning før tilsetning av prøve ved 517 nm. Dette gjøres i 3 paralleller.
6. 50 µl prøveløsning tilsettes hver parallell, og deretter omrøres løsningen med en plastspatel.
7. 30 sekunder etter tilsetning av prøve starter registrering av absorbans, og absorbansen måles hvert 60. sekund i totalt 5 minutter.

#### 5.2.4.2 Hemming av 15-lipoksygenase (15-LO test)

##### *Prinsipp*

Denne testen er basert på den 15-LO katalyserte reaksjonen mellom oksygen og en flerumettet fettsyre med 1,4-dien-type struktur, se figur 5-3. I denne testen benyttes 15-LO fra soyabønner. Dette enzymet er ikke identisk med mammalsk 15-LO, men det er en forholdsvis god korrelasjon mellom inhiberingsverdier til disse to enzymene. Som substrat benyttes linolsyre fordi den er billigere og mer stabil enn arakidonsyre. Hemming av peroksidering av linolsyre er sammenlignbar med hemming av peroksidering av arakidonsyre. Dermed kan 15-LO fra soyabønner og linolsyre brukes til å si noe om stoffers hemmingseffekt på 15-LO peroksidering av arakidonsyre i kroppen (Gleason et al., 1995; Utenova et al., 2007).

Målingen av enzymaktiviteten er basert på at linolsyre oksideres av enzymet til 13-hydroperoksy-(9Z,11E)-oktadekadiensyre (13-HPODE) (Lyckander og Malterud, 1996). De konjugerte dobbeltbindingene til 13-HPODE fører til en økning i absorpsjon ved 234 nm. Denne absorbansøkningen er proporsjonal med konsentrasjonen av 13-HPODE som dannes.



Figur 5-3: Reaksjon mellom linolsyre og 15-LO.



Ved tilstedeværelse av en hemmer vil økningen i absorpsjon minke. Ved å måle absorbansøkningen for blank og testsubstanser over en periode på 30-90 sekunder etter enzymtilsetning kan prosentvis enzymhemming beregnes etter formelen:

$$100 \times (A_2 - A_1) / A_2$$

Der  $A_1$  og  $A_2$  er absorbansøkning per tidsenhet med og uten testsubstans tilsatt (Malterud, 1998).

### *Reagenser og utstyr*

A: Boratbuffer, 0,2 M, pH 9,00. Laget med borsyre og natriumhydroksid.

B: Substratløsning: 50 µl linolsyre blandes med 150 µl etanol, og 50 ml A tilsettes.

B1: 20 ml B fortynnes med 300 ml A. Brukes samme dag.

C: Enzymløsning: 15-LO løses i A til en konsentrasjon på ca. 10 000 enheter/ml, som gir en absorbansøkning på 0,3-0,5 AU/min. Løsningen lages rett før bruk og oppbevares på is under hele forsøket.

DMSO

UV-spektrofotometer

Kvartskyvetter

Pipetter og pipettespisser

Plastspatler

### *Prosedyre*

1. Prøver som skal testes løses i DMSO til ønsket startkonsentrasjon. Fortynningsrekke lages av startkonsentrasjonene.
2. Quercetin løses i DMSO til passende konsentrasjon og brukes som positiv kontroll.
3. Spektrofotometeret nullstilles med en blindprøve med 0,95 ml A, 2 ml B1 og 0,05 ml DMSO. Løsningen blandes med plastspatel og kyvetten blir stående i blindprøveholderen under hele forsøket.
4. Blankprøver bestående av 0,90 ml A, 2,00 ml B1 og 0,05 ml DMSO (3 paralleller) settes i prøveholderne og omrøres godt med plastspatel. 0,05 ml C tilsettes med påfølgende omrøring. Absorbansøkning måles i perioden 30-90 sekunder etter tilsetning av C ved 234 nm.

5. Prøveløsning bestående av 0,90 ml A, 2,00 ml B1 og 0,05 ml prøveløsning (3 paralleller) settes i prøveholderne og omrøres godt med plastspatel. 0,05 ml C tilsettes med påfølgende omrøring. Absorbansøkning måles i perioden 30-90 sekunder etter tilsetning av C ved 234 nm.
6. Punkt 4 gjentas etter hver tredje måleserie med testløsninger.

#### **5.2.4.3 Hemming av xantin oksidase (XO-test)**

##### *Prinsipp*

Xantin oksidase (XO) oksiderer hypoxantin til xantin og videre til urinsyre. Under denne oksideringen dannes samtidig det reaktive superoksid radikalet eller hydrogen peroksid. Disse kan igjen omdannes til andre ROS, som er i stand til å initiere lipidperoksideringer av for eksempel flerumettede fettsyrer. Denne peroksideringen kan mediere vevs- og celledskade som et resultat av oksidativt stress (Akowuah et al., 2006; Meneshian og Bulkley, 2002). Et stort antall studier antyder at XO spiller en viktig rolle i forskjellige former for iskemi og andre typer vevsskader, inflammasjonssykdommer og kronisk hjertesvikt (Pacher et al., 2006). Hemming av XO kan derfor være viktig for å hemme oksidative stressmekanismer som er relatert til degenerative sykdommer (Akowuah et al., 2006).

Det finnes et legemiddel på markedet, allopurinol, som hemmer urinsyreproduksjonen ved å hemme XO enzymet. Allopurinol brukes idag mot urinsyregikt, men flere dyrestudier og små kliniske utprøvnings har vist at allopurinol og dens aktive metabolitt, oxypurinol, også har gitt lovende resultater i behandlingen av andre patologiske tilstander der XO er involvert (Pacher et al., 2006). Hemming av XO er derfor interessant, og prosent XO-hemming kan beregnes etter formelen:

$$100 \times (A_2 - A_1) / A_2$$

Der  $A_1$  og  $A_2$  er absorbansøkning per tidsenhet med og uten testsubstans tilsatt (Malterud, 1998).

### *Reagenser og utstyr*

A: Natriumkaliumfosfatbuffer, 0,05 M, pH 7,5. Laget av kaliumdihydrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) og natriumhydrogenfosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ).

B: Substratløsning: 10 mg hypoxantin løses i 500 ml destillert vann.

C: Enzymløsning: XO løses i A til en konsentrasjon på ca. 1,8 enheter/ml. Løsningen lages rett før bruk og oppbevares på is under hele forsøket.

DMSO

UV-spektrofotometer

Kvartskyvetter

Pipetter og pipettespisser

Plastpatler

### *Prosedyre*

1. Prøver som skal testes løses i DMSO til ønsket startkonsentrasjon. Fortynningsrekke lages av startkonsentrasjonene.
2. Quercetin løses i DMSO til passende konsentrasjon og brukes som positiv kontroll.
3. Spektrofotometeret nullstilles med en blindprøve bestående av 1,85 ml A, 0,05 ml DMSO, 1,0 ml destillert vann og 0,1 ml C. Løsningen blandes godt med plastspatel og kyvetten blir stående i blindprøveholderen under hele forsøket.
4. Blankprøver bestående av 1,85 ml A, 0,1 ml C og 0,05 ml DMSO (3 paralleller) settes i prøveholderne og omrøres godt med plastspatel. 1,0 ml B tilsettes med påfølgende omrøring. Absorbansøkning måles 30 sekunder etter tilsetting av B og deretter hvert 30. sekund i 5 minutter ved 290 nm.
5. Prøveløsning bestående av 1,85 ml A, 0,01 ml C og 0,05 ml prøveløsning (3 paralleller) settes i prøveholderne og omrøres godt med plastspatel. 1,0 ml B tilsettes med påfølgende omrøring. Absorbansøkning måles 30 sekunder etter tilsetting av B og deretter hvert 30. sekund i 5 minutter ved 290 nm.
6. Punkt 4 gjentas etter hver tredje måleserie med testløsninger.

## 5.3 Eksperimentell utførelse

### 5.3.1 Utgangsmateriale

Utgangsmateriale som ble benyttet var metanolrækstraktet av *B. petersianum* fremstilt av Anne Sveaass våren 2007 i forbindelse med hennes hovedoppgave ”Immunmodulerende polysakkarider isolert fra *Biophytum petersianum* Klotzsch”. *B. petersianum* ble samlet og identifisert av professor Drissa Diallo i Blendio, Mali i november 2002. Plantematerialet ble tørket og pulverisert og 350 g ble Soxhlet ekstrahert med diklormetan etterfulgt av metanol (Sveaass, 2007).

### NMR-spektroskopi

Det ble tatt  $^1\text{H}$ - og  $^{13}\text{C}$ -NMR-spekter av metanolrækstraktet. Prøven ble løst i deuterert metanol.

### Bioassay

Metanolrækstraktet ble testet for DPPH-scavenging, 15-LO-aktivitet og XO-hemming. Se kap. 5.2.4.

### Analytisk HPLC

Metanolrækstraktet ble analysert med HPLC.

### 5.3.2 Fraksjonering av metanolræktraktet

Fraksjonering av metanolrækstraktet er vist i flytskjema 1, s. 126.

### Væske-væske ekstraksjon

Metanolrækstrakt, 18,5 g, ble løst i 200 ml vann. Prøven ble deretter filtrert med filterpapir, og filtratet overført til skilletrakt. Suspensjonen ble ekstrahert med løsningsmidler med økende polaritet, se tabell 5-1.

Tabell 5-1: Løsemidler og mengder brukt ved ekstraksjon.

Løsningsmiddel	Mengde
Etylacetat	6 x 300 ml
1-Butanol	5 x 300 ml

Etter hver tilsetning av løsningsmiddel ble skilletrakten snudd opp ned flere ganger og ristet forsiktig. Så fikk skilletrakten stå i ro til fasene hadde separert seg. Da ble den organiske fasen tappet av, og filtrert over i forhåndsveide rundkolber. Ekstraktene i rundkolbene ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe og deretter veid.

Den vandige resten var på ca. 70 ml. Grunnen til at vannfasen hadde blitt så liten var fordi butanol også har tatt til seg vann, så noe vann ligger i butanolfasen. Vannfasen ble deretter filtrert og overført til en forhåndsveid rundkolbe. Uløselig materiale fra etylacetat-, butanol- og vannfasen som ble liggende på filterpapiret ble skrapet over i et felles begerglass. Dette ble stående i avtrekksskap til tørrhet og deretter veid. Vannfasen ble også dampet inn til tørrhet på samme måte som de andre fasene.

### **NMR-spektroskopi**

Det ble tatt  $^1\text{H}$ - og  $^{13}\text{C}$ -NMR-spekter av etylacetat-, butanol- og vannfasen. Etylacetat- og butanolfasen ble løst i deuterert metanol, mens vannfasen ble løst i deuteriumoksid.

### **Bioassay**

Etylacetat-, butanol- og vannfasen ble testet for DPPH-scavenging, 15-LO-aktivitet og XO-hemming. Se kap. 5.2.4. Alle fasene ble løst i DMSO.

### **Analytisk HPLC**

Analytisk HPLC ble utført på etylacetat-, butanol- og vannfasen, se metode tabell 5-2. Prøvene ble løst i acetonitril:vann (50:50), filtrert og det ble brukt en Chromolith RP-18 kolonne.

Tabell 5-2: Metode benyttet ved undersøkelse av etylacetat-, butanol- og vannfasen.

Tid (min)	% A (vann med 0,1 % TFA)	% B (ACN med 0,1 % TFA)	Flow(ml/min)
0	95	5	2
5	80	20	2
30	10	90	2
35	10	90	2
36	95	5	2
45	95	5	2

### 5.3.3 Fraksjonering av EtOAc-ekstraktet

Fraksjonering av EtOAc-ekstraktet er vist i flytskjema 1, s. 126.

#### Versaflash kolonnekromatografi

EtOAc-ekstraktet, 5,56 g, ble løst i 20 ml metanol og 5 ml vann, og filtrert. Filteret ble vasket med 5-10 ml metanol, og filtratet ble applisert på en versaflash C<sub>18</sub> kolonne (40 x150 mm).

Det som lå igjen på filterpapiret ble løst i metanol, overført til rundkolbe, dampet inn og veid.

Fraksjonen ble kalt for bunnfall.

Versaflashkolonnen ble først kondisjonert med 3 kolonnevolum av starteluenten. Det ble tilsammen samlet 50 fraksjoner: 14 fraksjoner à 30 ml (fraksjon 1-14), 28 fraksjoner à 20 ml (fraksjon 15-42) og 6 fraksjoner à 50 ml (fraksjon 43-48). Fraksjon 49 og 50 ble samlet i kolber på ca 250 ml (vaskefraksjon). Oversikt over hvilke mobilfaser som ble benyttet og mengde er gjengitt i tabell 5-3.

Tabell 5-3: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av EtOAc-ekstraktet.

Fraksjon	Mobilfase	Volum (ml)
1-10	Metanol:vann 50:50	ca. 300
11-29	Metanol:vann 65:35	ca. 420
30-48	Metanol	ca. 560
49-50	Aceton (vask)	ca. 500

#### DPPH-spraying

For å se hvilke fraksjoner som hadde radikalfangende evne, ble alle EtOAc-fraksjonene applisert på en normalfase TLC-plate og sprayet med DPPH-løsning som beskrevet kap.

5.2.3.3.

### Analytisk TLC og ceric-spraying

For å bestemme hvilke fraksjoner som var noenlunde like, og dermed kunne slås sammen, ble alle fraksjonene applisert på omvendtfase TLC. Plater med fraksjonene 1-28 ble utviklet med metanol:vann (65:35), og plater med fraksjonene 29-50 ble utviklet med 100 % metanol. Etter utvikling og tørking ble platene undersøkt i kort- og langbølget UV-lys og sprayet med ceric. De fraksjonene som så ut til å inneholde samme komponenter ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette ga fraksjonene E1- E13 (Tabell 5-4).

Tabell 5-4: sammenslåing av EtOAc-fraksjoner

Kolonnefraksjon	Fraksjon
2-3	E1
4-8	E2
9-10	E3
11-12	E4
13-15	E5
16-17	E6
18-22	E7
23-29	E8
30-33	E9
34-37	E10
38-45	E11
46-49	E12
50	E13

### NMR-spektroskopi

Det ble tatt  $^1\text{H}$  NMR-spektra av fraksjonene E1-E11 og bunnfall. Det ble ikke tatt  $^1\text{H}$  NMR-spektra av E12 og E13. I tillegg ble det tatt  $^{13}\text{C}$ -NMR-spektra av E1, E2, E4, E5, E7 og E9. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert metanol.

### Bioassay

Alle fraksjonene ble testet for XO-hemming ved konsentrasjonen 10  $\mu\text{g/ml}$ . Fraksjonene ble løst i DMSO.

### Analytisk HPLC

Analytisk HPLC ble tatt av alle fraksjonene, se metode tabell 5-5. Prøvene ble løst i metanol:vann (50:50), filtrert og det ble brukt en Chromolith RP-18 kolonne.

Tabell 5-5: Metode benyttet ved undersøkelse av etylacetat fraksjonene.

Tid (min)	% A (vann med 0,1 % TFA)	% B (ACN med 0,1 % TFA)	Flow(ml/min)
0	95	5	2
15	40	60	2
16	10	90	2
20	10	90	2
21	95	5	2
35	95	5	2

### 5.3.4 Videre separasjon av fraksjon E1

Separasjon av E1 er vist i flytskjema 2, s. 127.

#### Versaflash kolonnekromatografi

Fraksjon E1, 1,35 g, ble først løst i ca. 5 ml metanol:vann (10:90). Dette ga en dårlig løselighet og ytterligere 5 ml 100 % metanol ble tilsatt, og blandingen ble satt på ultralydbad. Prøven ble deretter filtrert med sprøytedrevet filter, og applisert på en versaflash C<sub>18</sub> kolonne (40 x150 mm). Kolonnen ble først kondisjonert med fire kolonnevolum av starteluenten. Det ble tilsammen samlet 28 fraksjoner à 30 ml. Oversikt over hvilke mobilfaser som ble benyttet og mengde er gjengitt i tabell 5-6.

Tabell 5-6: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av E1.

Fraksjon	Mobilfase	Volum (ml)
1-8	Metanol:vann 10:90	ca. 240
9-14	Metanol:vann 20:80	ca. 180
15-20	Metanol:vann 50:50	ca. 180
21-28	Metanol	ca. 240



### **Analytisk TLC og ceric-spraying**

For å bestemme hvilke fraksjoner som var noenlunde like, og dermed kunne slås sammen, ble alle fraksjonene applisert på omvendtfase TLC (Silicagel 60 RP-18 F<sub>254</sub> S). Platen med fraksjonene 1-14 ble utviklet med metanol:vann (30:70), og platen med fraksjonene 15-28 ble utviklet med metanol:vann (65:35). Etter utvikling og tørking ble platene undersøkt i kort- og langbølget UV-lys og sprayet med ceric. De fraksjonene som så ut til å inneholde samme komponenter ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette ga fraksjonene E1.1 til E1.7 (Tabell 5-7).

Tabell 5-7: sammenslåing av EtOAc-fraksjoner

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1-8	E1.1
9-13	E1.2
14-15	E1.3
16-17	E1.4
18-19	E1.5
20-23	E1.6
24-28	E1.7

### **NMR-spektroskopi**

Det ble tatt <sup>1</sup>H NMR-spektra av alle fraksjonene. I tillegg ble det tatt <sup>13</sup>C-NMR-spekter av E1.2 fordi den så renest ut etter å ha vurdert <sup>1</sup>H NMR-spektra av alle E1 -fraksjonene. Som løsningsmiddel ble deuterert metanol brukt.

### **Bioassay**

Alle fraksjonene ble testet for XO-hemming ved konsentrasjonen 10 µg/ml. Fraksjonene ble løst i metanol.

### **Analytisk HPLC**

Analytisk HPLC ble tatt av alle fraksjonene, se metode tabell 5-8. Prøvene ble løst i metanol:vann (50:50), filtrert og det ble brukt en Chromolith RP-18 kolonne.

Tabell 5-8: Metode benyttet ved undersøkelse av E1-fraksjonene.

Tid (min)	% A (vann med 0,1% TFA)	% B (ACN med 0,1% TFA)	Flow(ml/min)
0	95	5	2
15	70	30	2
17	40	60	2
18	95	5	2
32	95	5	2

### 5.3.5 Videre separasjon av fraksjon E1.2

Separasjon av E1.2 er vist i flytskjema 2, s. 127.

#### Versaflash kolonnekromatografi

Fraksjon E1.2, 86 mg, ble først løst i ca. 8 ml metanol:vann (50:50). Prøven ble deretter filtrert med sprøytedrevet filter, og applisert på en versaflash C<sub>18</sub> kolonne (40 x150 mm). Kolonnen ble først kondisjonert med tre kolonnevolum av starteluenten. Det ble tilsammen samlet 36 fraksjoner: 34 fraksjoner à 10 ml (fraksjon 0-33), 1 fraksjon à 55 ml (fraksjon 34) og 1 fraksjon à 150 ml (fraksjon 35). Oversikt over hvilke mobilfaser som ble benyttet og mengde er gjengitt i tabell 5-9.

Tabell 5-9: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av E1.2.

Fraksjon	Mobilfase	Volum (ml)
0-12	Metanol:vann 5:95	ca. 130
13-20	Metanol:vann 10:90	ca. 80
21-27	Metanol:vann 20:80	ca. 70
28-33	Metanol:vann 50:50	ca. 60
34	Metanol	ca. 55
35	Metanol:vann 5:95	ca. 150

#### Analytisk TLC og ceric-spraying

For å bestemme hvilke fraksjoner som var noenlunde like, og dermed kunne slås sammen, ble alle fraksjonene applisert på normalfase TLC (Silicagel 60 F<sub>254</sub>). Platen ble ikke utviklet da det holdt å undersøke platen i kort- og langbølget UV-lys slik den var med fraksjonene påsatt. Deretter ble platen sprayet med ceric. De fraksjonene som så ut til å inneholde samme komponenter ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette ga fraksjonene E1.2.1 til E1.2.11 (Tabell 5-10).

Tabell 5-10: sammenslåing av E1.2-fraksjoner.

Kolonnefraksjon	Fraksjon
3-6	E1.2.1
4-12	E1.2.2
13-14	E1.2.3
15-18	E1.2.4
19-21	E1.2.5
22-24	E1.2.6
25-27	E1.2.7
28-29	E1.2.8
30-33	E1.2.9
34	E1.2.10
35	E1.2.11

### NMR-spektroskopi

Det ble tatt  $^1\text{H}$  NMR-spektra av fraksjonene E1.2.1 til E1.2.9. I tillegg ble det tatt  $^{13}\text{C}$ -NMR-spekter av E1.2.2. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert metanol.

### Analytisk HPLC

Analytisk HPLC ble utført av fraksjon E1.2.1, E1.2.2 og E1.2.3, se tabell 5-11 for metode. Prøvene ble løst i acetonitril:vann (50:50), og det ble brukt en Varian RP-18 kolonne.

Tabell 5-11: Metode benyttet ved undersøkelse av E1.2-fraksjonene.

Tid (min)	% A (vann med 0,1% TFA)	% B (ACN med 0,1% TFA)	Flow(ml/min)
0	95	5	1
5	95	5	1
10	60	40	1
15	60	40	1
16	95	5	1
25	95	5	1

### 5.3.6 Videre separasjon av fraksjon E1.2.2

Separasjon av E1.2.2 er vist i flytskjema 2, s. 127.

#### Preparativ HPLC

Fraksjon E1.2.2, 16 mg, ble løst i 1,5 ml acetonitril:vann (5:95), filtrert og injisert i loopinjektoren. Kolonnen var en C<sub>18</sub> preparativ HPLC kolonne. Som mobilfase ble det brukt acetonitril:vann i gradientsystem, se tabell 5-12. Ut i fra absorbansen ved 280 nm som ble vist i kromatogrammet underveis i kjøringen, ble det samlet inn fraksjoner.

Tabell 5-12: Metode benyttet ved fraksjonering av E1.2.2.

Tid (min)	% A (vann med 0,1% TFA)	% B (ACN med 0,1% TFA)	Flow(ml/min)
0	95	5	20
5	95	5	20
10	60	40	20
20	60	40	20

#### Analytisk HPLC

Fraksjonene som inneholdt topper fra preparativ HPLC ble undersøkt på analytisk HPLC. Metoden som ble brukt er den samme som tidligere, se tabell 5-11. Det var 3 fraksjoner som så relativt rene ut, E1.2.2.4, E1.2.2.7 og E1.2.2.8. Disse ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, og veid.

#### NMR-spektroskopi

Det ble tatt <sup>1</sup>H NMR-spektra av alle 3 fraksjonene. Kun fraksjon E1.2.2.7 var interessant. Den ble derfor undersøkt videre med <sup>13</sup>C-, DEPT135- og HMQC-NMR. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert metanol.

### 5.3.7 Videre separasjon av fraksjon E1.6

Separasjon av E1.6 er vist i flytskjema 2, s. 127.

#### Versaflash kolonnekromatografi

Fraksjon E1.6, 444 mg, ble først løst i ca. 5 ml metanol med et par dråper vann. Prøven ble deretter filtrert med sprøytedrevet filter, og applisert på en versaflash C<sub>18</sub> kolonne (40 x150 mm). Kolonnen ble først kondisjonert med tre kolonnevolum av starteluenten. Det ble

tilsammen samlet 44 fraksjoner à 22 ml og 1 fraksjon à 300 ml (vaskefraksjon). Oversikt over hvilke mobilfaser som ble benyttet og mengde er gjengitt i tabell 5-13.

Tabell 5-13: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av E1.6.

Fraksjon	Mobilfase	Volum (ml)
1-12	Metanol:vann 20:80	ca. 260
13-21	Metanol:vann 40:60	ca. 200
22-33	Metanol:vann 70:30	ca. 260
34-45	Metanol	ca. 540

### Analytisk TLC og ceric-spraying

For å bestemme hvilke fraksjoner som var noenlunde like, og dermed kunne slås sammen, ble fraksjonene 1, 5, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 35, 37, 40, 42, 44 og 45 applisert på normalfase TLC (Silicagel 60 F<sub>254</sub>). Platen ble utviklet med etylacetat:metanol:eddiksyre (80:20:1). Etter utvikling og tørking ble platene undersøkt i kort- og langbølget UV-lys og sprayet med ceric. De fraksjonene som så ut til å inneholde samme komponenter ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette ga fraksjonene E1.6.1 til E1.6.8 (Tabell 5.14).

Tabell 5-14: sammenslåing av E1.6-fraksjoner

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1-20	E1.6.1
21	E1.6.2
22	E1.6.3
23	E1.6.4
24-26	E1.6.5
27-31	E1.6.6
32-34	E1.6.7
35-45	E1.6.8

### NMR-spektroskopi

Det ble tatt <sup>1</sup>H NMR-spektra av alle fraksjonene. Deuterert metanol ble brukt som løsningsmiddel.

### **Analytisk HPLC**

Analytisk HPLC ble kjørt av fraksjon E1.6.1 til E1.6.6, se tabell 5-15 for metode. Prøvene ble løst i metanol:vann (50:50), og det ble brukt en Varian RP-18 kolonne.

Tabell 5-15: Metode benyttet ved undersøkelse av E1.6.1 til E1.6.6.

Tid (min)	% A (vann med 0,1% TFA)	% B (ACN med 0,1% TFA)	Flow(ml/min)
0	80	20	1
5	60	40	1
15	50	50	1
20	50	50	1
21	20	80	1
25	20	80	1
26	80	20	1
35	80	20	1

### **5.3.8 Videre separasjon av fraksjon E1.6.4**

Separasjon av E1.6.4 er vist i flytskjema 2, s. 127.

### **Preparativ HPLC**

Fraksjon E1.6.4, 82 mg, ble løst i 4,5 ml metanol:vann (60:40) og filtrert. Deretter ble 1,5 ml av løsningen injisert på en C<sub>18</sub> preparativ HPLC kolonne. Som mobilfase ble det brukt acetonitril:vann i gradientsystem, se tabell 5-15, men her er flowen (mobilfasehastigheten) 20 ml/min. Samme prosedyre ble utført tre ganger. Ut i fra absorbansen ved 280 nm som ble vist i kromatogrammet underveis i kjøringen, ble det samlet inn fraksjoner.

### **Analytisk HPLC**

Fraksjonene som inneholdt topper fra preparativ HPLC ble undersøkt på analytisk HPLC for å se hvilke fraksjoner som var relativt rene, og hvilke av parallellene som var like og dermed kunne slås sammen. Metoden som ble brukt er den samme som tidligere, se tabell 5-15. Det ble i alt samlet 14 fraksjoner. Disse ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, og veid.

### **NMR-spektroskopi**

Det ble tatt <sup>1</sup>H NMR-spektra av alle 14 fraksjonene. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert metanol.

### **5.3.9 Videre separasjon av fraksjon E1.6.4.3**

Separasjon av E1.6.4.3 er vist i flytskjema 2, s. 127.

#### **Preparativ HPLC**

Fraksjon E1.6.4.3, 22 mg, ble løst i 1,5 ml metanol:vann (50:50), filtrert og injisert i loopinjektoren. Kolonnen var en C<sub>18</sub> preparativ HPLC kolonne. Som mobilfase ble det brukt acetonitril:vann i gradientsystem, se tabell 5-12. Ut i fra absorbansen ved 280 nm som ble vist i kromatogrammet underveis i kjøringen, ble det samlet inn fraksjoner.

#### **Analytisk HPLC**

Fraksjonene som inneholdt topper fra preparativ HPLC ble undersøkt på analytisk HPLC. Metoden som ble brukt er den samme som tidligere, se tabell 5-15. Det var en fraksjon som så ren og interessant ut, E1.6.4.3.8. Denne ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, og veid.

#### **NMR-spektroskopi**

Det ble tatt <sup>1</sup>H NMR-spekter av E1.6.4.3.8. Som løsningsmiddel ble deuterert metanol benyttet.

### **5.3.10 Videre separasjon av fraksjon E1.6.4.3.8**

Separasjon av E1.6.4.3.8 er vist i flytskjema 2, s. 127.

#### **Preparativ HPLC**

Fraksjon E1.6.4.3.8, 13 mg, ble løst i 1,5 ml metanol:vann (50:50), filtrert og injisert i loopinjektoren. Kolonnen var en C<sub>18</sub> semipreparativ HPLC kolonne. Som mobilfase ble det brukt acetonitril:vann i gradientsystem, se tabell 5-15, men her er flowen 6 ml/min. Ut i fra absorbansen ved 280 nm som ble vist i kromatogrammet underveis i kjøringen, ble det samlet inn fraksjoner.

### **Analytisk HPLC**

Fraksjonene som inneholdt topper fra preparativ HPLC ble undersøkt på analytisk HPLC. Metoden som ble brukt er den samme som tidligere, se tabell 5-15. Det var en fraksjon som så ren og interessant ut, E1.6.4.3.8.7. Denne ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, og veid.

### **NMR-spektroskopi**

Det ble tatt  $^1\text{H}$ -NMR, APT-, HSQC-, HMBC- og COSY-spektra av fraksjon E1.6.4.3.8.7. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert metanol.

### **Massespektrometri**

E1.6.4.3.8.7 ble sendt til kjemisk institutt for elektrospray massespektrometri.

## **5.3.11 Videre separasjon av fraksjon E4 og E5**

### **Sammenslåing**

Fraksjon E4 og E5 så ut til å inneholde de samme forbindelsene etter sammenligning av  $^1\text{H}$ -NMR-spektra og ble derfor slått sammen til E4-5. Separasjon av E4-5 er vist i flytskjema 3, s. 128.

### **Versaflash kolonnekromatografi**

Fraksjon E4-5, 395 mg, ble løst i ca. 6 ml metanol:vann (60:40), og blandingen ble satt på ultralydbad. Prøven ble deretter filtrert med sprøytetrevet filter, og applisert direkte på en versaflash  $\text{C}_{18}$  kolonne (40 x150 mm). Kolonnen ble først kondisjonert med fem kolonnevolum av starteluenten. Det ble tilsammen samlet 42 fraksjoner à 30 ml. Oversikt over hvilke mobilfaser som ble benyttet og mengde er gjengitt i tabell 5-16.

Tabell 5-16: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av E4-5.

Fraksjon	Mobilfase	Volum (ml)
1-4	Metanol:vann 20:80	ca. 120
5-10	Metanol:vann 40:60	ca. 180
11-20	Metanol:vann 50:50	ca. 300
21-27	Metanol:vann 60:40	ca. 210
28-34	Metanol:vann 70:30	ca. 210
35-42	Metanol	ca. 240



### Analytisk TLC og ceric-spraying

For å bestemme hvilke fraksjoner som var noenlunde like, og dermed kunne slås sammen, ble fraksjonene 1, 4, 6, 9, 10, 11, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 39 og 41 applisert på omvendtfase TLC (Silicagel 60 RP-18 F<sub>254</sub> S). Platene ble utviklet med metanol:vann (65:35). Etter utvikling og tørking ble platene undersøkt i kort- og langbølget UV-lys og sprayet med ceric. De fraksjonene som så ut til å inneholde samme komponenter ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette ga fraksjonene E4-5.1 til E4-5.6 (Tabell 5-17).

Tabell 5-17: sammenslåing av E4-5-fraksjoner

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1-10	E4-5.1
11-19	E4-5.2
20-24	E4-5.3
25-27	E4-5.4
28-29	E4-5.5
30-42	E4-5.6

### NMR-spektroskopi

Det ble tatt <sup>1</sup>H NMR-spektra av alle fraksjonene. Som løsningsmiddel ble deuterert metanol brukt.

### Analytisk HPLC

Analytisk HPLC ble utført på fraksjon E4-5.2, E4-5.3 og E4-5.4, som var de mest interessante fraksjonene ut i fra <sup>1</sup>H- NMR-spektra. Prøvene ble løst i metanol:vann (50:50), filtrert og det ble brukt en Varian RP-18 kolonne.

Tabell 5-18: Metode benyttet ved undersøkelse av E4-5-fraksjoner.

Tid (min)	% A (vann med 0,1% TFA)	% B (ACN med 0,1% TFA)	Flow(ml/min)
0	70	30	1
10	70	30	1
20	50	50	1
21	20	80	1
30	20	80	1
31	70	30	1
40	70	30	1

### 5.3.12 Videre separasjon av fraksjon E4-5.2

Separasjon av fraksjon E4-5.2 er vist i flytskjema 4, s. 129.

#### Versaflash kolonnekromatografi

Fraksjon E4-5.2, 94 mg, ble først løst i ca. 5 ml metanol:vann (60:40). Prøven ble deretter filtrert med sprøytedrevet filter, og applisert på en versaflash C<sub>18</sub> kolonne (23 x 110 mm). Kolonnen ble først kondisjonert med fire kolonnevolum av starteluenten. Det ble tilsammen samlet 47 fraksjoner à 10 ml. Oversikt over hvilke mobilfaser som ble benyttet og mengde er gjengitt i tabell 5-19.

Tabell 5-19: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering E4-5.2.

Fraksjon	Mobilfase	Volum (ml)
0-8	Metanol:vann 20:80	ca. 90
9-15	Metanol:vann 40:60	ca. 70
16-21	Metanol:vann 50:50	ca. 60
22-34	Metanol:vann 60:60	ca. 130
35-47	Metanol	ca. 170

#### Analytisk TLC og ceric-spraying

For å bestemme hvilke fraksjoner som var noenlunde like, og dermed kunne slås sammen, ble fraksjonene 0, 1, 4, 7, 9, 11, 13, 15, 16, 17, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 34, 35, 36, 37, 39, 40, 41, 42, 44 og 47 applisert på omvendtfase TLC. Platen ble utviklet med metanol:vann (50:50). Etter utvikling og tørking ble platene undersøkt i kort- og langbølget UV-lys og sprayet med ceric. De fraksjonene som så ut til å inneholde samme komponenter ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette ga fraksjonene E4-5.2.1 til E4-5.2.9 (Tabell 5-20).

Tabell 5-20: sammenslåing av E4-5.2-fraksjoner

Kolonnefraksjon	Fraksjon
0	E4-5.2.1
1-7	E4-5.2.2
8-16	E4-5.2.3
17-19	E4-5.2.4
20-23	E4-5.2.5
24-25	E4-5.2.6
26-28	E4-5.2.7
29-32	E4-5.2.8
33-47	E4-5.2.9

### NMR-spektroskopi

Det ble tatt  $^1\text{H}$  NMR-spektra av alle fraksjonene. Deuterert metanol ble brukt som løsningsmiddel.

### Analytisk HPLC

Analytisk HPLC ble utført på fraksjon E4-5.2.5 til E4-5.2.7. Prøvene ble løst i metanol:vann (50:50), og det ble brukt en Varian RP-18 kolonne.

Tabell 5-21: Metode benyttet ved undersøkelse av E4-5.2.5 til E4-5.2.7.

Tid (min)	% A (vann med 0,1% TFA)	% B (ACN med 0,1% TFA)	Flow(ml/min)
0	75	25	1
5	75	25	1
17	70	30	1
19	50	50	1
23	50	50	1
24	25	25	1
30	25	25	1

### 5.3.13 Videre separasjon av fraksjon E4-5.2.5

Separasjon av fraksjon E4-5.2.5 er vist i flytskjema 4, s. 129.

### **Preparativ HPLC**

Fraksjon E4-5.2.5, 36 mg, ble løst i 3 ml metanol:vann (90:10) og filtrert. Deretter ble 1,5 ml av løsningen injisert på en C<sub>18</sub> preparativ HPLC kolonne. Som mobilfase ble det brukt acetonitril:vann i gradientsystem, se tabell 5-21, men her er flowen 20 ml/min. Samme prosedyre ble utført to ganger. Ut i fra absorbansen ved 280 nm som ble vist i kromatogrammet underveis i kjøringen, ble det samlet inn fraksjoner.

### **Analytisk HPLC**

Fraksjonene som inneholdt topper fra preparativ HPLC ble undersøkt på analytisk HPLC for å se hvilke fraksjoner som var relativt rene, og hvilke av parallellene som var like og dermed kunne slås sammen. Metoden som ble brukt er den samme som tidligere, se tabell 5-21. Det ble i alt samlet 5 fraksjoner. Disse ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, og veid.

### **NMR-spektroskopi**

Det ble tatt <sup>1</sup>H NMR-spekter av alle fraksjonene. <sup>13</sup>C-NMR-, HSQC- og HMBC-spektra ble i tillegg tatt av fraksjon E4-5.2.5.4. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert metanol.

### **5.3.14 Videre arbeid med fraksjon E1.6.4.3.8.7 og E4-5.2.5.4**

#### **Sammenslåing**

Fraksjon E1.6.4.3.8.7 og E4-5.4.2.5.4 så ut til å inneholde samme stoff etter sammenligning av <sup>1</sup>H-NMR-spektra og ble derfor slått sammen.

#### **Bioassay**

Den sammenslåtte fraksjonen ble testet for DPPH-scavenging, 15-LO-aktivitet og XO-hemming, se kap. 5.2.4. Fraksjonen ble løst i DMSO.

### **5.3.15 Videre separasjon av fraksjon E4-5.2.6**

Separasjon av fraksjon E4-5.2.6 er vist i flytskjema 4, s. 129.

### **Preparativ HPLC**

Fraksjon E4-5.2.6, 19 mg, ble løst i 1,5 ml metanol:vann (90:10) og filtrert. Deretter ble løsningen injisert på en C<sub>18</sub> preparativ HPLC kolonne. Som mobilfase ble det brukt acetonitril:vann i gradientsystem, se tabell 5-21, men her er flowen 20 ml/min. Ut i fra absorbansen ved 280 nm som ble vist i kromatogrammet underveis i kjøringen, ble det samlet inn fraksjoner.

### **Analytisk HPLC**

Fraksjonene som inneholdt topper fra preparativ HPLC ble undersøkt på analytisk HPLC. Metoden som ble brukt er den samme som tidligere, se tabell 5-21. Det ble i alt samlet fire fraksjoner. Disse ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, og veid.

### **NMR-spektroskopi**

Det ble tatt <sup>1</sup>H NMR-spekter av alle fraksjonene. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert metanol.

## **5.3.16 Videre separasjon av fraksjon E4-5.2.7**

Separasjon av fraksjon E4-5.2.7 er vist i flytskjema 4, s. 129.

### **Preparativ HPLC**

Fraksjon E4-5.2.7, 13 mg, ble løst i 1,5 ml metanol:vann (90:10) og filtrert. Deretter ble løsningen injisert på en C<sub>18</sub> preparativ HPLC kolonne. Som mobilfase ble det brukt acetonitril:vann i gradientsystem, se tabell 5-21, men her er flowen 20 ml/min. Ut i fra absorbansen ved 280 nm som ble vist i kromatogrammet underveis i kjøringen, ble det samlet inn fraksjoner.

### **Analytisk HPLC**

Fraksjonene som inneholdt topper fra preparativ HPLC ble undersøkt på analytisk HPLC. Metoden som ble brukt er den samme som tidligere, se tabell 5-21. Ut fra dette ble to fraksjoner dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, og veid.

### **NMR-spektroskopi**

Det ble tatt  $^1\text{H}$  NMR-spekter av begge fraksjonene. Deuterert metanol ble brukt som løsningsmiddel.

### **5.3.17 Videre separasjon av fraksjon E4-5.3**

Separasjon av fraksjon E4-5.3 er vist i flytskjema 3, s. 128.

### **Preparativ HPLC**

Fraksjon E4-5.3, 65 mg, ble løst i 4,5 ml metanol:vann (90:10) og filtrert. Deretter ble 1,5 ml av løsningen injisert på en  $\text{C}_{18}$  preparativ HPLC kolonne. Som mobilfase ble det brukt acetonitril:vann i gradientsystem, se tabell 5-18, men her er flowen 20 ml/min. Samme prosedyre ble utført tre ganger. Ut i fra absorbansen ved 280 nm som ble vist i kromatogrammet underveis i kjøringen, ble det samlet inn fraksjoner.

### **Analytisk HPLC**

Fraksjonene som inneholdt topper fra preparativ HPLC ble undersøkt på analytisk HPLC for å se hvilke fraksjoner som var relativt rene, og hvilke av parallellene som var like og dermed kunne slås sammen. Metoden som ble brukt er den samme som tidligere, se tabell 5-18. Det ble i alt samlet fem fraksjoner. Disse ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, og veid.

### **NMR-spektroskopi**

Det ble tatt  $^1\text{H}$  NMR-spekter av alle fraksjonene. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert metanol.

### **5.3.18 Videre separasjon av fraksjon E4-5.3.5**

Separasjon av fraksjon E4-5.3.5 er vist i flytskjema 3, s. 128.

### **Preparativ HPLC**

Fraksjon E4-5.3.5, 3,7 mg, ble løst i 1,5 ml metanol:vann (90:10), filtrert og injisert i loopinjektoren. Kolonnen var en  $\text{C}_{18}$  semipreparativ HPLC kolonne. Som mobilfase ble det brukt acetonitril:vann i gradientsystem, se tabell 5-18, men her er flowen 6 ml/min. Ut i fra

absorbansen ved 280 nm som ble vist i kromatogrammet underveis i kjøringen, ble det samlet inn fraksjoner.

### **Analytisk HPLC**

Fraksjonene som inneholdt topper fra preparativ HPLC ble undersøkt på analytisk HPLC. Metoden som ble brukt er den samme som tidligere, se tabell 5-18. Det var to fraksjoner som så interessante ut, E4-5.3.5.6 og E4-5.3.5.7. Disse ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, og veid.

### **NMR-spektroskopi**

Det ble tatt  $^1\text{H}$  NMR-spekter av begge fraksjonene. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert metanol.

### **5.3.19 Videre separasjon av fraksjon E4-5.4**

Separasjon av fraksjon E4-5.4 er vist i flytskjema 3, s. 128.

### **Preparativ HPLC**

Fraksjon E4-5.4, 20 mg, ble løst i 1,5 ml metanol:vann (60:40), filtrert og injisert i loopinjektoren. Kolonnen var en  $\text{C}_{18}$  semipreparativ HPLC kolonne. Som mobilfase ble det brukt acetonitril:vann i gradientsystem, se tabell 5-18, men her er flowen 6 ml/min. Ut i fra absorbansen ved 280 nm som ble vist i kromatogrammet underveis i kjøringen, ble det samlet inn fraksjoner.

### **Analytisk HPLC**

Fraksjonene som inneholdt topper fra preparativ HPLC ble undersøkt på analytisk HPLC. Metoden som ble brukt er den samme som tidligere, se tabell 5-18. Det var fire fraksjoner som så interessante ut. Disse ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, og veid.

### **NMR-spektroskopi**

Det ble tatt  $^1\text{H}$  NMR-spekter av de fire fraksjonene. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert metanol.

### 5.3.20 Videre arbeid med fraksjon E4-5.3.5.6 og E4-5.4.4

#### Sammenslåing

Fraksjon E4-5.3.5.6 og E4-5.4.4 så ut til å inneholde de samme forbindelsene etter sammenligning av  $^1\text{H}$ -NMR-spektra og ble derfor slått sammen til fraksjon E4-5A, se flytskjema 4, s. 129.

#### NMR-spektroskopi

Det ble tatt  $^{13}\text{C}$ -NMR-spekter av den sammenslåtte fraksjonen. Deuterert metanol ble brukt som løsningsmiddel.

### 5.3.21 Videre separasjon av fraksjon E6, E7 og E8

#### Sammenslåing

Fraksjon E6, E7 og E8 så ut til å inneholde de samme forbindelsene etter sammenligning av  $^1\text{H}$ -NMR-spektra og ble derfor slått sammen til E6-8. Separasjon av fraksjon E6-8 er vist i flytskjema 5, s. 130.

#### Sephadex kolonnekromatografi

Fraksjon E6-8, 254 mg, ble løst i ca. 3,5 ml metanol, og blandingen ble satt på ultralydbad. Prøven ble deretter filtrert med sprøytetrevet filter, og applisert på en Sephadex-kolonne. Kolonnen ble først kondisjonert med 200 ml av starteluenten. Det ble til sammen samlet 35 fraksjoner. Oversikt over hvilke mobilfaser som ble benyttet og mengde er gjengitt i tabell 5-22.

Tabell 5-22: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av E6-8.

Fraksjon	Mobilfase	Volum (ml)
1-12	Metanol:vann 50:50	ca. 200
13-19	Metanol:vann 65:35	ca. 100
20-32	Metanol	ca. 200
33	Aceton:vann 70:30	ca. 100
34	Metanol (vask)	ca. 200

#### Analytisk TLC og ceric-spraying

For å bestemme hvilke fraksjoner som var noenlunde like, og dermed kunne slås sammen, ble alle fraksjonene applisert på omvendtfase TLC (Silikagel 60 RP-18 F<sub>254</sub> S). Platene med



fraksjonene 0-27 ble utviklet med metanol:vann (50:50), mens platen med fraksjonene 21-34 ble utviklet med 100 % metanol. Etter utvikling og tørking ble platene undersøkt i kort- og langbølget UV-lys og sprayet med ceric. De fraksjonene som så ut til å inneholde samme komponenter ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette ga fraksjonene E6-8.1 til E6-8.12 (Tabell 5-23).

Tabell 5-23: sammenslåing av E6-8-fraksjoner

Kolonnefraksjon	Fraksjon
0-2	E6-8.1
3-4	E6-8.2
5-9	E6-8.3
10-18	E6-8.4
19-21	E6-8.5
22-23	E6-8.6
24-25	E6-8.7
26	E6-8.8
27-30	E6-8.9
31	E6-8.10
32	E6-8.11
33-34	E6-8.12

### NMR-spektroskopi

Det ble tatt  $^1\text{H}$  NMR-spektra av alle fraksjonene. Som løsningsmiddel ble deuterert metanol brukt. Fraksjon E6-8.10 og E6-8.11 var mest interessante, men det hadde blitt dannet en del bunnfall i rørene. Derfor ble disse to fraksjonene overført til hver sin rundkolbe, dampet inn på rotavapor og oljepumpe og reløst i deuterert kloroform. Dette var fraksjonene enda dårligere løst i. De ble da dampet inn igjen og reløst i deuterert aceton. I deuterert aceton var fraksjonene like dårlig løst. Tilsetning av et par dråper deuterert metanol hjalp ikke stort, og forsøket med nye  $^1\text{H}$ -NMR-spektra ble droppet.

### **Analytisk HPLC**

Analytisk HPLC ble tatt av fraksjon E6-8.10 og E6-8.11, som var de mest interessante fraksjonene ut i fra  $^1\text{H}$ - NMR-spektra. Prøvene ble løst i metanol, filtrert og det ble brukt en Varian RP-18 kolonne.

Tabell 5-24: Metode benyttet ved undersøkelse av E6-8.10 og E6-8.11.

Tid (min)	% A (vann med 0,1% TFA)	% B (ACN med 0,1% TFA)	Flow(ml/min)
0	70	30	1
5	70	30	1
7	70	30	1
10	40	60	1
20	30	70	1
21	30	70	1
23	70	30	1
30	70	30	1

### **5.3.22 Videre separasjon av fraksjon E6-8.10**

Separasjon av fraksjon E6-8.10 er vist i flytskjema 5, s. 130.

### **Preparativ HPLC**

Fraksjon E6-8.10, 34 mg, ble løst i 3 ml metanol og filtrert. Deretter ble 1,5 ml av løsningen injisert på en  $\text{C}_{18}$  preparativ HPLC kolonne. Som mobilfase ble det brukt acetonitril:vann i gradientsystem, se tabell 5-24, men her er flowen 20 ml/min. Samme prosedyre ble utført to ganger. Ut i fra absorbansen ved 280 nm som ble vist i kromatogrammet underveis i kjøringen, ble det samlet inn fraksjoner.

### **Analytisk HPLC**

Fraksjonene som inneholdt topper fra preparativ HPLC ble undersøkt på analytisk HPLC. Metoden som ble brukt er den samme som tidligere, se tabell 5-24. Ut fra dette ble fire fraksjoner dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, og veid.

### **NMR-spektroskopi**

Det ble tatt  $^1\text{H}$  NMR-spekter av alle fraksjonene. Deuterert metanol ble brukt som løsningsmiddel.

### 5.3.23 Videre separasjon av fraksjon E6-8.11

Separasjon av fraksjon E6-8.11 er vist i flytskjema 5, s. 130.

#### Preparativ HPLC

Fraksjon E6-8.11, 16 mg, ble løst i 3 ml acetonitril:metanol (90:10) og filtrert. Deretter ble 1,5 ml av løsningen injisert på en C<sub>18</sub> preparativ HPLC kolonne. Som mobilfase ble det brukt acetonitril:vann i gradientsystem, se tabell 5-24, men her er flowen 20 ml/min. Samme prosedyre ble utført to ganger. Ut i fra absorbansen ved 280 nm som ble vist i kromatogrammet underveis i kjøringen, ble det samlet inn fraksjoner.

#### Analytisk HPLC

Fraksjonene som inneholdt topper fra preparativ HPLC ble undersøkt på analytisk HPLC. Metoden som ble brukt er den samme som tidligere, se tabell 5-24. Ut fra dette ble seks fraksjoner dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, og veid.

#### NMR-spektroskopi

Det ble tatt <sup>1</sup>H NMR-spekter av alle fraksjonene. Deuterert metanol ble brukt som løsningsmiddel.

### 5.3.24 Videre separasjon av fraksjon E6-8.11.1 til E6-8.11.4

#### Sammenslåing

Fraksjon E6-8.11.1 til E6-8.11.4 så ut til å inneholde de samme forbindelsene etter sammenligning av <sup>1</sup>H-NMR-spektra og HPLC-kromatogrammer, og ble derfor slått sammen.

#### NMR-spektroskopi

Det ble tatt <sup>1</sup>H- og <sup>13</sup>C-NMR-spekter av den sammenslåtte fraksjonen. Deuterert metanol ble brukt som løsningsmiddel.

#### Preparativ HPLC

<sup>1</sup>H- og <sup>13</sup>C-NMR-spekter av den sammenslåtte fraksjonen viste svake signaler og det hadde blitt dannet en del grums i NMR-røret. Derfor ble den sammenslåtte fraksjonen dampet inn, reløst i 1,5 ml metanol og filtrert. Deretter ble løsningen injisert på en C<sub>18</sub> preparativ HPLC kolonne. Som mobilfase ble det brukt acetonitril:vann i gradientsystem, se tabell 5-24, men

her er flowen 20 ml/min. Ut i fra absorbansen ved 280 nm som ble vist i kromatogrammet underveis i kjøringen, ble det samlet inn fraksjoner.

### **Analytisk HPLC**

Fraksjonene som inneholdt topper fra preparativ HPLC ble undersøkt på analytisk HPLC. Metoden som ble brukt er den samme som tidligere, se tabell 5-24. Ut fra dette ble fraksjonen E6-8.11A dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, og veid.

### **NMR-spektroskopi**

Det ble tatt  $^1\text{H}$ -NMR-spekter av fraksjon E6-8.11A med deuterert metanol som løsningsmiddel.

### **5.3.25 Fraksjonering av BuOH-ekstraktet**

Fraksjonering av BuOH-ekstraktet er vist i flytskjema 6, s. 131.

### **Versaflash kolonnekromatografi**

BuOH-ekstraktet, 9,42 g, ble løst i 10 ml metanol:vann (25:75). Dette løste ikke ekstraktet og litt og litt metanol ble tilsatt til i alt 50 ml. Deretter ble ekstraktet satt på ultralydbad i 10 minutter, men fortsatt var mye uløst. For å få det løst ble ekstraktet da filtrert med glassintertrakt, og filteret vasket et par ganger med metanol. Prøven ble deretter filtrert med sprøytedrevet filter, og applisert på en versaflash  $\text{C}_{18}$  kolonne (80 x 300 mm). Kolonnen ble først kondisjonert med to kolonnevolum av starteluenten. Det ble tilsammen samlet 178 fraksjoner: fire fraksjoner à 60 ml (fraksjon 0-3), 164 fraksjoner à 30 ml (fraksjon 4-167) og ti fraksjoner à kolber på 100-300 ml (fraksjon 168-4177). Oversikt over hvilke mobilfaser som ble benyttet og mengde er gjengitt i tabell 5-25.

Tabell 5-25: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av BuOH-ekstraktet.

Fraksjon	Mobilfase	Volum (ml)
0-23	Metanol:vann 25:75	ca. 840
24-52	Metanol:vann 50:50	ca. 870
53-117	Metanol:vann 75:25	ca. 1950
118-167	Metanol	ca. 1500
168-174	Etanol:vann 96:4	1000
175-177	Aceton:vann 70:30 (vask)	1500

### **Analytisk TLC og ceric-spraying**

For å bestemme hvilke fraksjoner som var noenlunde like, og dermed kunne slås sammen, ble de fleste fraksjonene applisert på omvendtfase TLC (Silicagel 60 RP-18 F<sub>254</sub> S). Platen ble utviklet med metanol:vann (25:75),(50:50),(75:25) og 100 % metanol. Etter utvikling og tørking ble platene undersøkt i kort- og langbølget UV-lys og sprayet med ceric. De fraksjonene som så ut til å inneholde samme komponenter ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette ga fraksjonene B1- B10. (Tabell 5-26).

Tabell 5-26: sammenslåing av BuOH-fraksjoner

Kolonnefraksjon	Fraksjon
0-4	B1
5-29	B2
30-47	B3
48-58	B4
59-73	B5
74-115	B6
116-120	B7
121-138	B8
139-169	B9
170-177	B10

### **NMR-spektroskopi**

Alle fraksjonene fra BuOH-ekstraktet ble analysert ved hjelp av <sup>1</sup>H NMR spektroskopi. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert metanol.

#### **5.3.26 Videre separasjon av fraksjon B5 og B6**

##### **Sammenslåing**

Fraksjon B5 og B6 så ut til å inneholde de samme forbindelsene etter sammenligning av <sup>1</sup>H-NMR-spektra og ble derfor slått sammen til B5-6. Fraksjonering av B5-6 er vist i flytskjema 6, s. 131.

### Sephadex kolonnekromatografi

Fraksjon B5-6, 1030 mg, ble løst i ca. 8 ml metanol og noen dråper vann, og blandingen ble satt på ultralydbad. Prøven ble deretter filtrert med sprøytetrevet filter, og applisert på en Sephadex-kolonne. Kolonnen ble først kondisjonert med 200 ml av starteluenten. Det ble til sammen samlet 48 fraksjoner à 20 ml og en fraksjon à 200 ml (vaskefraksjon). Oversikt over hvilke mobilfaser som ble benyttet og mengde er gjengitt i tabell 5-27.

Tabell 5-27: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av B5-6.

Fraksjon	Mobilfase	Volum (ml)
0-6	Metanol:vann 25:75	ca. 70
7-23	Metanol:vann 50:50	ca. 340
24-36	Metanol:vann 75:25	ca. 260
37-46	Metanol	ca. 200
47-48	Aceton:vann 70:30	ca. 220

### Analytisk TLC og ceric-spraying

For å bestemme hvilke fraksjoner som var noenlunde like, og dermed kunne slås sammen, ble alle fraksjonene applisert på omvendtfase TLC (HPTLC-fertigplatten RP-18 WF<sub>254s</sub>). Platene var forskjellig fra de tidligere brukte omvendtfase TLC-platene på grunn av mangel på disse. Platene ble utviklet med metanol:vann (50:50), (75:25) og 100 % metanol. Etter utvikling og tørking ble platene undersøkt i kort- og langbølget UV-lys og sprayet med ceric. De fraksjonene som så ut til å inneholde samme komponenter ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette ga fraksjonene B5-6.1 til B5-6.9 (Tabell 5-28).

Tabell 5-28: sammenslåing av B5-6-fraksjoner

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1-2	B5-6.1
3-4	B5-6.2
5-12	B5-6.3
13-20	B5-6.4
21-28	B5-6.5
29-31	B5-6.6
32-40	B5-6.7
41-47	B5-6.8
48	B5-6.9

### NMR-spektroskopi

Det ble tatt  $^1\text{H}$  NMR-spektra av alle fraksjonene. Som løsningsmiddel ble deuterert metanol brukt.

## 6. Resultater og diskusjon

### 6.1 Isolasjon, strukturoppklaring og bioassay

#### 6.1.1 Metanolrækstraktet

##### NMR-spektroskopi

$^1\text{H}$  NMR-spektret til metanolrækstraktet (NMR-spektrum 1, s. 132) viser at ekstraktet består av en del fett med signaler rundt 1,28 ppm, som er karakteristisk for alkankjeder. Det er også en del signaler i området 3-4,5 ppm, og dette er typisk for karbohydrat. Signalet ved 3,35 ppm tilhører metanol, mens 4,88 ppm tilhører vann. Området 6,3-7,8 ppm er typisk for aromatiske forbindelser og olefiner.

$^{13}\text{C}$ -NMR-spektret til metanolrækstraktet (NMR-spektrum 2, s. 132) bekrefter de funnene som er gjort i protonspektret. Signalene rundt 29 ppm kommer fra fett og andre mettede forbindelser. Spektret viser flest signaler ved 60-80 ppm. Dette kan tilhøre oksygenerte karboner fra karbohydrater. I området 90-130 ppm ser man aromat- og olefinsignaler. Signalene i området 15-35 ppm er typisk for alifatiske karboner, mens signalet ved 81 ppm er en maskinfeil (artefakt).

##### Bioassay

##### DPPH-scavenging

Assay for radikalscavenging (DPPH-test) ble utført på metanolrækstraktet. Quercetin ( $\text{IC}_{50} = 11,8 \pm 0,5 \mu\text{M}$ ,  $3,4 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$ ) ble brukt som positiv kontroll. Resultatene er vist i Tabell 6-1.

Tabell 6-1: DPPH-test på metanolrækstraktet

Ekstrakt	Kons. (mg/ml)	Kons. i kyvette ( $\mu\text{g/ml}$ )	Scavengerakt. (%)	SD ( $\pm$ )	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
Metanol- Rækstrakt	20	333,3	85,6	2,6	$152 \pm 11$
	10	166,7	52,4	2,0	
	5	83,3	34,2	1,5	



Metanolrækstraktet viste seg å ha en ganske lav radikalscavenger aktivitet med en IC<sub>50</sub>-verdi på  $152 \pm 11$  µg/ml. Dette er konsentrasjonen av rækstraktet som gir 50 % scavenging av DPPH.

### 15-LO

Det ble utført 15-LO test på metanolrækstraktet med quercetin som positiv kontroll (IC<sub>50</sub> =  $108 \pm 2$  µM,  $32,6 \pm 0,6$  µg/ml).

Tabell 6-2: 15-LO-hemming av metanolrækstraktet

Ekstrakt	Kons. (mg/ml)	Kons. i kyvette (µl/ml)	% hemming	SD (±)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
Metanol-rækstrakt	5	83,3	25,7	7,3	>83

Metanolekstraktets hemming av 15-LO steg ikke over 50 % ved den målte konsentrasjonen. Dermed ble ikke IC<sub>50</sub>-verdien utregnet fordi den regnes som svært lav.

### XO-hemming

Det ble utført XO-hemming på metanolrækstraktet. Quercetin ble brukt som positiv kontroll.

Tabell 6-3: XO-test på metanolrækstraktet, 26. mai 2010. Quercetin: IC<sub>50</sub> =  $3,8 \pm 0,7$  µM,  $1,1 \pm 0,2$  µg/ml.

Ekstrakt	Kons. (mg/ml)	Kons. i kyvette (µl/ml)	% hemming	SD (±)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
Metanol-Rækstrakt	2,5	41,7	61,6	4,7	$26,3 \pm 5,7$
	1,25	20,8	42,5	6,4	
	0,625	10,4	27,8	9	

Tabell 6-4: XO-test på metanolrækstraktet, 23. mars 2011. Quercetin:  $IC_{50} = 2,7 \pm 0,4 \mu M$ ,  $0,8 \pm 0,1 \mu g/ml$ .

Ekstrakt	Kons. (mg/ml)	Kons. i kyvette ( $\mu l/ml$ )	% hemming	SD ( $\pm$ )	$IC_{50}$ ( $\mu g/ml$ )
Metanol-	5	83,3	72,0	0,5	$29 \pm 2$
Rækstrakt	2,5	41,7	59,3	1,7	
	1,25	20,8	41,4	2,2	

Rækstraktets XO-hemming ble målt i mai 2010 og mars 2011. Resultatet viser en konsentrasjonsavhengig hemming av XO-aktiviteten, med en  $IC_{50}$ -verdi på  $26,3 \pm 5,7$  og  $29 \pm 2 \mu g/ml$ . Disse verdiene ser ut til å være forholdsvis like på grunn av stort standardavvik. Hemmingen er konsentrasjonsavhengig, men svakere enn hemmingsaktiviteten av den positive kontrollen quercetin.

### 6.1.2 Fraksjonering av metanolrækstraktet

#### Væske-væske ekstraksjon

Metanolrækstraktet, 18,5 g, ble separert ved bruk av væske-væske ekstraksjon med EtOAc og BuOH, se kap 5.3.2. De mest upolare stoffene ble ekstrahert over i EtOAc-fasen, stoffer med middels polaritet ble fordelt i BuOH-fasen, de mest polare stoffene var igjen i vannfasen og til slutt gjenstod en uløselig rest. BuOH-fasen var den største fraksjonen, på 9,42 g, se tabell 6-5.

Tabell 6-5: Faser av metanolrækstraktet med beregning av utbytte i mengde og prosent av påsatt mengde.

Ekstrakt	Utbytte (g)	Utbytte (%)
EtOAc-fase	5,56	33,0
BuOH-fase	9,42	55,9
Vannfase	0,97	5,8
Utfelt/uløselig	0,90	5,3
Totalt	16,85	

## **NMR-spektroskopi**

### **EtOAc-fasen**

$^1\text{H}$ -NMR-spektret til EtOAc-fasen (NMR-spektrum 3, s. 133) så ut til å inneholde mange interessante signaler i olefin- og aromatområdet ved 5-8 ppm. Det er mange signaler rundt 1,26 ppm, og mye av dette er nok fett. I tillegg er det en del signaler i karbohydratområdet (3-4,5 ppm). Spektret har også en del signaler som kommer fra løsningsmidlet EtOAc. Disse signalene kom rundt 1,26 ppm, 2,0 ppm og 4,10 ppm. Signalene ved 4,88 ppm og 3,31 ppm skyldes henholdsvis vann og metanol.

$^{13}\text{C}$ -NMR-spektret (NMR-spektrum 4, s. 133) stemmer med  $^1\text{H}$ -NMR-spektret. Signalene ved 20-40 ppm kan tilhøre fett. I området 60-80 ppm ser vi signaler for karbonatomer fra sukker, og i området 100-130 ppm kan signalene komme fra aromatiske- eller olefiniske grupper. Det sterke signalet ved 48-50 ppm skyldes metanol.

### **BuOH-fasen**

$^1\text{H}$ -NMR-spektret for BuOH-fasen (NMR-spektrum 5, s. 134) viser lignende signaler som i EtOAc-fasen. Det er signaler ved 6-8 ppm, som kommer fra olefiner og aromater. I området 1,2-1,5 ppm er det signaler fra fett og butanol. De sterke signalene ved 0,9 ppm og 3,5 ppm kommer også fra butanol. Ved 3-4 ppm ser vi mange signaler som kan komme fra karbohydrater.

I  $^{13}\text{C}$ -NMR-spektret (NMR-spektrum 6, s. 134) ser vi mange signaler fra butanol ved 14,2 ppm, 20,0 ppm, 35,7 ppm og 62,6 ppm. Grunnen til dette er ufullstendig inndamping av butanol etter ekstrahering. Ellers ser vi signaler fra karbohydrater i området 60-80 ppm, og aromatiske signaler ved 90-120 ppm. Dette stemmer godt overens med  $^1\text{H}$ -NMR-spektret.

### **Vannfasen**

Både  $^1\text{H}$ - og  $^{13}\text{C}$ -NMR-spektrene til vannfasen viser at det for det meste består av karbohydrater. Signalet i  $^1\text{H}$ -NMR-spektret ved 4,7 ppm tilhører vann. Vi ser ingen signaler i olefin- og aromatområdet.

## Bioassay

### DPPH-scavenging

Assay for radikalscavenging (DPPH-test) ble utført på alle fasene av metanolrækstraktet.

Quercetin ( $IC_{50} = 11,8 \pm 0,5 \mu M$ ,  $3,4 \pm 0,2 \mu g/ml$ ) ble brukt som positiv kontroll. Resultatene er vist i tabell 6-6.

Tabell 6-6: DPPH-test på ulike faser av metanolrækstraktet.

Ekstrakt	Kons. (mg/ml)	Kons. i kyvette ( $\mu g/ml$ )	Scavengerakt. (%)	SD ( $\pm$ )	$IC_{50}$ ( $\mu g/ml$ )
EtOAc- fase	10	166,7	58,6	1,2	$67,8 \pm 4,5$
	5	83,3	54,3	0,6	
	2,5	41,7	39,8	3,4	
BuOH-fase	10	166,7	39,2	0,2	> 167
	5	83,3	25,7	1,9	
	2,5	41,7	18,4	2,1	
Vannfase	10	166,7	36,8	0,5	> 167
	5	83,3	22,1	0,3	
	2,5	41,7	12,3	0,5	

Tallene fra tabellen viser at BuOH- og vannfasen er veldig dårlige radikalscavengere. EtOAc-fasen har bedre aktivitet, og denne aktiviteten er mye høyere enn for metanolrækstraktet (se tabell 6-1). Dette tyder på at de inaktive stoffene fra metanolrækstraktet har samlet seg i BuOH- og vannfasen ved væske-væske ekstraksjon, mens de stoffene som har radikalfangeraktivitet må være mer upolare og er oppkonsentrert i EtOAc-fasen.

### 15-LO

Det ble utført 15-LO test på alle fasene av metanolrækstraktet med quercetin som positiv kontroll ( $IC_{50} = 108 \pm 2 \mu M$ ,  $32,6 \pm 0,6 \mu g/ml$ ).

Tabell 6-7: 15-LO-hemming av ulike faser av metanolrækstraktet.

Ekstrakt	Kons. (mg/ml)	Kons. i kyvette (µg/ml)	% hemming	SD (±)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
EtOAc- fase	5	83,3	43,5	3,8	> 83
BuOH-fase	5	83,3	10,1	4,2	> 83
Vannfase	10	166,7	8,8	3,4	> 167

Resultatene for hemming av 15-LO viser at både EtOAc-, BuOH- og vannfasen er dårlige 15-LO hemmere.

### XO-hemming

Det ble utført XO-hemming på alle fasene av metanolrækstraktet med quercetin som positiv kontroll.

Tabell 6-8: XO-test på ulike faser av metanolrækstraktet, 26. mai 2010. Quercetin: IC<sub>50</sub> = 3,8 ± 0,7 µM, 1,1 ± 0,2 µg/ml.

Ekstrakt	Kons. (mg/ml)	Kons. i kyvette (µg/ml)	% hemming	SD (±)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
EtOAc- fase	1,25	20,8	65,5	1,8	9,8 ± 0,9
	0,625	10,4	51,6	2,4	
	0,3125	5,2	33,5	3,4	
BuOH-fase	5	83,3	59,0	2,7	59,2 ± 6,1
	2,5	41,7	40,8	2,7	
Vannfase	10	166,7	10,8	5,2	> 167
	5	83,3	7,7	5,4	

Tabell 6-9: XO-test på ulike faser av metanolrækstraktet 23. mars 2011. Quercetin:  $IC_{50} = 2,7 \pm 0,4 \mu M$ ,  $0,8 \pm 0,1 \mu g/ml$ .

Ekstrakt	Kons. (mg/ml)	Kons. i kyvette ( $\mu g/ml$ )	% hemming	SD ( $\pm$ )	$IC_{50}$ ( $\mu g/ml$ )
EtOAc- fase	1,25	20,8	59,4	2,4	$14 \pm 1$
	0,625	10,4	40,6	0,3	
BuOH-fase	5	83,3	40,7	3,3	$> 83$
Vannfase	10	166,7	-1,3	4,1	Inaktiv

XO-hemming ble målt på EtOAc-, BuOH og vannfasen i mai 2010 og mars 2011.  $IC_{50}$ -verdien for Quercetin som ble benyttet som positiv kontroll, stemmer omtrent med tidligere rapportert verdi (Pham, 2009). Resultatet viser at EtOAc-fasen har mye høyere effekt enn BuOH- og vannfasen. EtOAc-fasen har også noe høyere effekt en metanolrækstraktet (se tabell 6-3 og 6-4), noe som tyder på at stoffer som er XO-hemmere fra metanolrækstraktet må ha samlet seg i EtOAc-fasen ved væske-væske ekstraksjon. Sammenlikning av resutater gjort i mai 2010 og mars 2011 viser at alle 3 fasene fikk lavere aktivitet ved siste måling. Dette kan bety at stoffer med aktivitet har blitt dekomponert under lagring. Metanolrækstraktet viste ikke forskjellige verdier ved måling i mai 2010 og mars 2011. En mulig forklaring er at metanolrækstraktet kan ha inneholdt stoffer som stabiliserer XO-hemmende stoffer i ekstraktet mot dekomponering ved lagring. Disse stoffene kan ha blitt borte ved ekstraksjon.

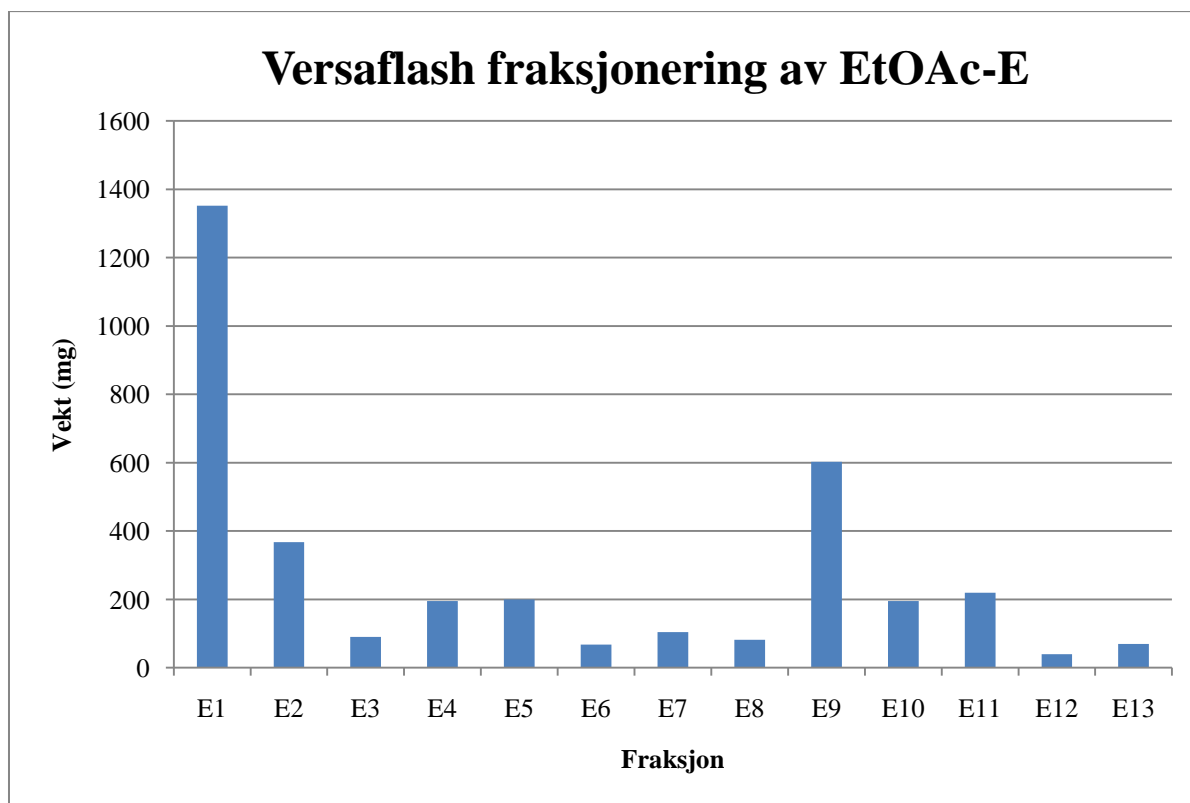
### Videre arbeid

Ut fra resultatene fra bioassay (DPPH-test, 15-LO-hemming og XO-hemming), ser det er ut som EtOAc-fasen av metanolrækstraktet er mest potent. EtOAc-fasen ser ut til å være litt mer potent enn rækstraktet, og BuOH-fasen er noe mindre potent. Vannfasen er den minste fasen og så godt som inaktiv i alle de 3 testene. Dette kan se ut til å stemme godt overens med NMR-spektra for de 3 fasene, ettersom NMR-spektret av vannfasen ser ut til å inneholde mest karbohydrater, og ingen signaler i aromat- og olefinområdet er å se. NMR-spektra av EtOAc- og BuOH-fasen, viser både signaler for karbohydrater og interessante signaler i aromat- og olefinområdet. På bakgrunn av dette ble det bestemt å fokusere på EtOAc-fasen i videre opprensning. BuOH-fasen skulle opprenses hvis det var tid.

### 6.1.3 Fraksjonering av EtOAc-ekstraktet

#### Versaflash kolonnekromatografi

Bunnfallet til EtOAc-ekstraktet veide 1,59 g. Resten av EtOAc-ekstraktet, 3,97 g, ble separert på en versaflashkolonne, se kap 5.3.3. Det ble samlet 50 fraksjoner som på bakgrunn av analytisk TLC etterfulgt av DPPH-spraying, ble slått sammen til fraksjonene E1-E13. Dette ga et utbytte på 3,59 g (90 %). Figur 6-1 viser vekt av fraksjonene.



Figur 6-1: Vekt av fraksjoner fra EtOAc-E.

#### NMR-spektroskopi

Det ble tatt  $^1\text{H}$  NMR-spektra av fraksjonene E1-E11 og bunnfall. I tillegg ble det tatt  $^{13}\text{C}$ -NMR-spektra av E1, E2, E4, E5, E7 og E9 fordi de var mest interessante.

$^1\text{H}$ - og  $^{13}\text{C}$ -NMR-spektra til fraksjon E1 og E2 inneholder mange signaler nær hverandre i aromat- og olefinområdet, og veldig mye karbohydrater. Fraksjon E2 viser også en del signaler i alifatområdet (1-3 ppm).

NMR-spektra til fraksjon E3, E4 og E5 viser alle komplekse signaler i aromatområdet, med lignende mønster. De inneholder alle en del fett og noe sukker.

<sup>1</sup>H-NMR-spektra til fraksjon E6, E7 og E8 viser mange signaler i aromat- og olefinområdet. I disse fraksjonene er det mindre sukker enn i de første, men muligens mer fett.

<sup>1</sup>H-NMR-spektra til E9, E10 og E11 viser at de inneholder mest fett og er lite interessante. Det samme gjelder bunnfallet som også inneholder mest fett, og få signaler i aromatområdet.

## Bioassay

### XO-hemming

Alle fraksjonene ble testet for XO-hemming ved konsentrasjonen 10 µg/ml, se tabell 6-10.

Quercetin ble brukt som positiv kontroll ( $IC_{50} = 8,1 \pm 0,8 \mu M$ ,  $2,4 \pm 0,2 \mu g/ml$ ).

Tabell 6-10: XO-hemming av EtOAc-fraksjoner ved 10 µg/ml.

Fraksjon	Vekt (mg)	% hemming ved 10 µg/ml	SD (±)	% av total hemming
E1	1352	51,1	3,9	28,2
E2	368	43,1	5,7	6,5
E3	90	53,1	3,8	2,0
E4	195	71,7	3	5,7
E5	200	76,8	3	6,3
E6	68	71,3	2,9	2,0
E7	104	79,2	2,7	3,4
E8	82	80	1,9	2,7
E9	603	54,5	4,6	13,4
E10	195	27,9	4,5	2,2
E11	220	13,1	7,9	1,2
E12	40	6,5	4,4	0,1
E13	70	3,1	3,8	0,1
Bunnfall	1590	40,6	4,7	26,4
Totalt	5177			100,0

$IC_{50}$ -verdien til quercetin er høyere enn ved tidligere XO-tester utført med metanolrækstrakt, EtOAc-, BuOH- og vannfasen. Avviket kan muligens skyldes ulike batcher av enzym. Dette gjør at forsøket ikke er reproducerbart, men sier likevel noe om XO-hemmingen i disse fraksjonene. Resultatene viser at fraksjon E4-E8 er mest potente med 70-80 prosent hemming av enzymet ved konsentrasjonen 10 µg/ml. Hvis man ser på prosent av total hemming vil derimot fraksjon E1 ha en betydelig større andel (28,2 prosent) fordi denne fraksjonen er mye større enn de andre. Det samme gjelder bunnfallet.



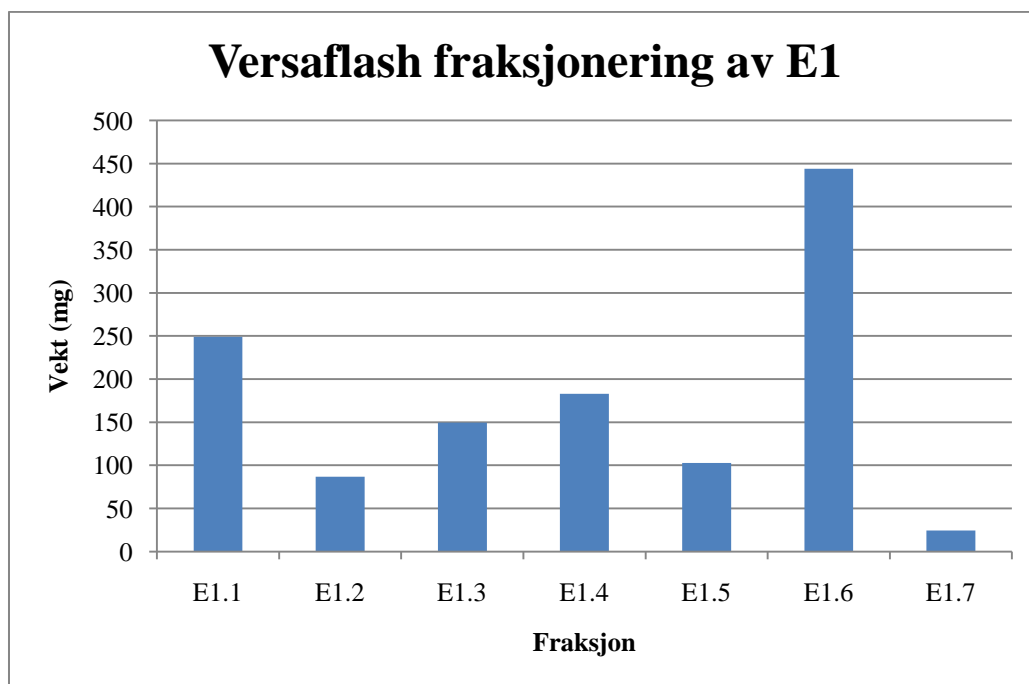
## Videre arbeid

Ut i fra resultatene fra XO-hemming og NMR-spektra ble det bestemt å fokusere på E1 for videre opprensning. Fraksjon E1 har et interessant NMR-spekter, den er en potent XO-hemmer og det er den største fraksjonen fra versaflashkolonnen.

### 6.1.4 Videre separasjon av fraksjon E1

#### Versaflash kolonnekromatografi

Fraksjon E1, 1,35 g, ble separert på en versaflashkolonne, se kap 5.3.4. Det ble samlet 28 fraksjoner som på bakgrunn av analytisk TLC etterfulgt av ceric-spraying, ble slått sammen til fraksjonene E1.1-E1.7. Dette ga et utbytte på 1,24 g (92 %). Figur 6-2 viser vekt av fraksjonene.



Figur 6-2: Vekt av fraksjoner fra separasjon av E1 på versaflashkolonne.

#### NMR-spektroskopi

<sup>1</sup>H-NMR-spektret til E1.2 er mest interessant fordi det ser renest ut, og inneholder skarpe topper i aromatområdet i forhold til spektrene til de andre fraksjonene. De andre fraksjonene har signaler i aromat- og olefinområdet som er svakere, eller flere topper nær hverandre som tyder på en mer komplisert blanding enn fraksjon E1.2.

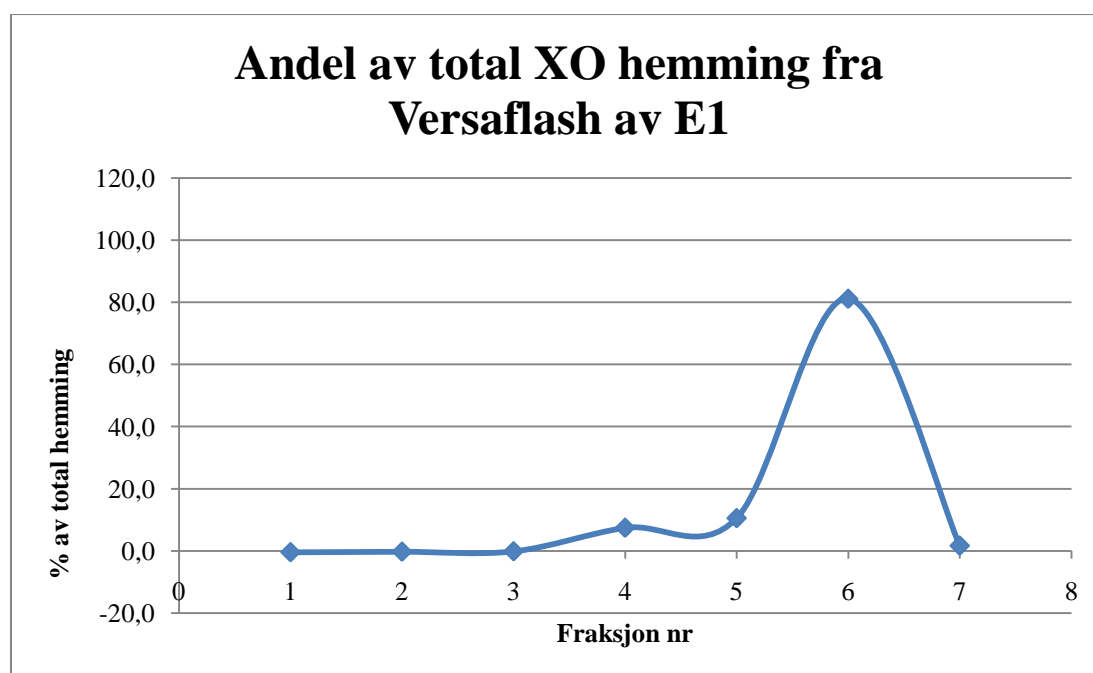
## XO-hemming

Alle fraksjonene ble testet for XO-hemming ved konsentrasjonen 10 µg/ml, se tabell 6-11.

Andel av total XO-hemming er vist i figur 6-3. Quercetin ble brukt som positiv kontroll (Estimert IC<sub>50</sub> = 0,36 µM, 0,11 µg/ml).

Tabell 6-11: XO-hemming av E1-fraksjoner ved 10 µg/ml.

Fraksjon	vekt (mg)	% hemming ved 10 µg/ml	SD (±)
E1.1	248,9	-0,6	10
E1.2	86,7	-1	7,3
E1.3	149,4	-0,3	5,9
E1.4	182,9	14	6,9
E1.5	102,9	35,2	6,1
E1.6	444,1	62,8	9,8
E1.7	24,5	23,4	7,2



Figur 6-3: Andel av total XO-hemming fra E1-fraksjoner.

Resultatene fra XO-hemmingen viser at tallverdiene for quercetin ikke stemmer overens med de andre XO-målingene utført med metanolråekstrakt, EtOAc-, BuOH- og vannfasen. Dette gjør at forsøket ikke er reproducerbart, og tallene kan ikke brukes til å sammenligne med andre XO-forsøk. Resultatene sier likevel noe om XO-hemmingen i disse fraksjonene, og

både tabell 6-11 og figur 6-3 viser at fraksjon E1.6 står for mesteparten av XO-hemmingen i E1-fraksjonene. Fraksjon E1.6 er også den største fraksjonen.

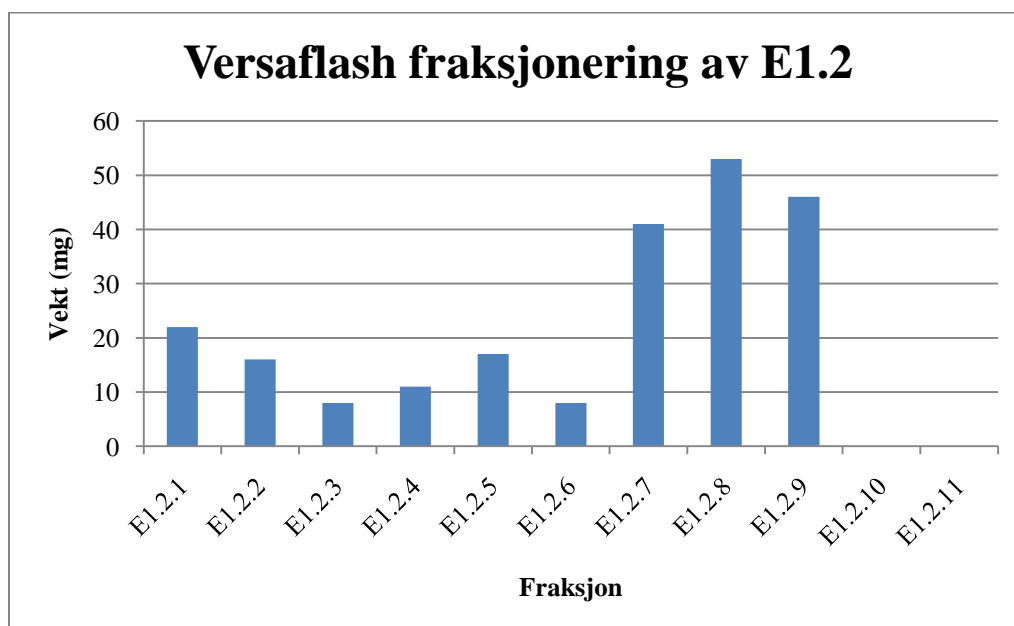
### Videre arbeid

For videre arbeid ble fraksjon E1.2 prioritert til videre fraksjonering fordi den så relativt ren ut og virket spesielt interessant på  $^1\text{H}$ -NMR-spektret, selv om den var inaktiv som XO-hemmer. Det ble også bestemt å arbeide videre med fraksjon E1.6 fordi den hadde størst XO-hemmende effekt og var også den største fraksjonen.

### 6.1.5 Videre separasjon av fraksjon E1.2

#### Versaflash kolonnekromatografi

Fraksjon E1.2, 86 mg, ble separert på en versaflashkolonne, se kap 5.3.5. Det ble samlet 36 fraksjoner som på bakgrunn av analytisk TLC etterfulgt av ceric-spraying, ble slått sammen til fraksjonene E1.2.1-E1.2.11. Figur 6-4 viser vekt av fraksjon E1.2.1-E1.2.9.



Figur 6-4: Vekt av fraksjon E1.2.1-E1.2.9 etter separasjon av E1.2 på versaflashkolonne.

Fraksjon E1.2.1-E1.2.9 veide tilsammen 222 mg. Dette gir et utbytte på 258 %. Kun fraksjonene E1.2.7-E1.2.9 veide tilsammen 140 mg. Det er mest sannsynlig (ut i fra NMR-spektra) at disse fraksjonene hovedsakelig består av stasjonærfase og forurensninger som satt

igjen i kolonnen fra tidligere bruk. Med tanke på dette ble ikke fraksjon E1.2.10 og E1.2.11 dampet inn og veid.

### **NMR-spektroskopi**

$^1\text{H}$ -NMR-spektra viser at fraksjon E1.2.2 er mest interessant. Denne fraksjonen er ganske ren og viser flere tydelige topper i aromat- og olefinområdet. Spektret til fraksjon E1.2.2 inneholder også høye signaler i området 2,5-3,8 ppm, som kan komme fra protoner i  $\text{OCH}_3$ , eller umettet  $\text{CH}_2$  eller  $\text{CH}_3$ .

$^{13}\text{C}$ -NMR-spektret til fraksjon E1.2.2 viser 8 hovedtopper, i tillegg til metanoltoppen ved 49 ppm og artefakten ved 81 ppm. Signalet ved 29 ppm kan komme fra fett eller alkaner. Det er 6 signaler i området 115-155 ppm, og disse kan komme fra karboner på en benzenring. To av disse seks signalene er mer deshieldet enn de andre og kan være bundet til karboner med oksygen i nærheten. Signalet ved 170 ppm kan komme fra karbonet i karbonyl.

Spektrene til fraksjon E1.2.2 var ikke rene nok til å finne ut hva slags stoff det var, og fraksjonen ble rensset opp videre.

## **6.1.6 Videre separasjon av fraksjon E1.2.2**

### **HPLC**

Fraksjon E1.2.2, 16 mg, ble separert og fraksjonert på en preparativ omvendtfase HPLC kolonne, se kap 5.3.6. På bakgrunn av absorbans ved 280 nm registrert i kromatogrammet og analytisk HPLC ble det dampet inn 3 fraksjoner, E1.2.2.4 (1,5 mg), E1.2.2.7 (6,5 mg) og E1.2.2.8 (3,1 mg).

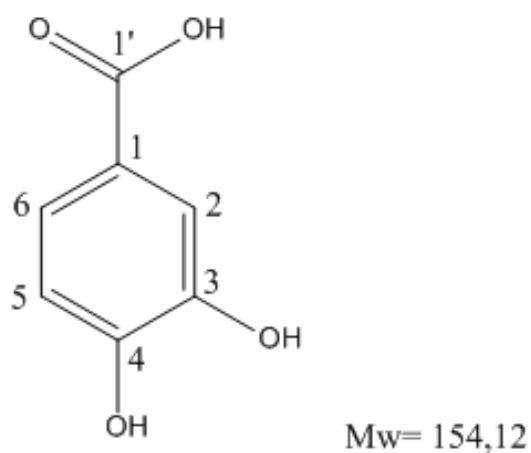
### **NMR-spektroskopi**

$^1\text{H}$ -NMR-spektra viste at kun fraksjon E1.2.2.7 var interessant. De to andre fraksjonene var for små og viste uinteressante spektra med mye støy.

Det ble tatt  $^1\text{H}$ -NMR-,  $^{13}\text{C}$ -NMR-, DEPT135- og HMQC-spektra av fraksjon E1.2.2.7. Dataene fra NMR-spektra er vist i tabell 6-12 (NMR-spektra 7-10, s. 135-136). Ut fra spektraldata og sammenligning med litteratordata ble fraksjon E1.2.2.7 identifisert som 3,4-dihydroksybenzosyre (protocatechusyre), se figur 6-5. Sammenligningene er vist i tabell 6-13

og 6-14.  $^{13}\text{C}$ -NMR-referansedata (Scott, 1972) stemmer godt overens med  $^{13}\text{C}$ -NMR-data til E1.2.2.7.  $^1\text{H}$ -NMR-referansedata (Zhang et al., 1998) er noe forskjellig fra  $^1\text{H}$ -NMR-data til E1.2.2.7. Grunnen til dette er fordi  $^1\text{H}$ -NMR-referansen har brukt deuterert DMSO, mens vi har brukt deuterert metanol som NMR-løsemiddel. Spektret til E1.2.2.7 inneholder også overlappende signaler i området 7,4 ppm som gjør det vanskelig å si om det er dubletter eller doble dubletter man ser.

Det ble tatt  $^1\text{H}$ - og  $^{13}\text{C}$ -NMR-spektra av kommersiell 3,4-dihydroksybenzosyre (protocatechusäure CHR purum, Chemische fabrik, Sveits) (NMR-spektra 11-12, s. 137). Sammenligning med E1.2.2.7 viser at spektrene er svært like i aromat- og olefinområdet, og  $^1\text{H}$ -NMR-spektret for kommersiell 3,4-dihydroksybenzosyre viser også overlappende topper i området 7,4 ppm.  $^1\text{H}$ - og  $^{13}\text{C}$ -spektra av E1.2.2.7 viser at fraksjonen ikke er helt ren, men det ble bestemt å ikke bruke mer tid på å rense det opp siden kommersiell substans er tilgjengelig.



Figur 6-5: Molekylstruktur av 3,4-dihydroksybenzosyre.

Tabell 6-12: Data av  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR, DEPT135 og HMQC av E1.2.2.7.

H/C nummer	$^1\text{H}$ -NMR (posisjon (ppm), multiplisitet, koblingskonstant, J)	$^{13}\text{C}$ -NMR (ppm)	DEPT135	HMQC (ppm)
1	-	123,1	-	-
2	7,43 m (overlappende signaler)	117,7	CH/CH <sub>3</sub>	117,7 x 7,43
3	-	146,1	-	-
4	-	151,5	-	-
5	6,79 dd (J=1,4 Hz og 7,1 Hz)	115,7	CH/CH <sub>3</sub>	115,7 x 6,79
6	7,42 m (overlappende signaler)	123,9	CH/CH <sub>3</sub>	123,9 x 7,42
1'	-	170,2	-	-

Tabell 6-13: Sammenligning av observerte  $^{13}\text{C}$ -NMR for fraksjon E1.2.2.7 med data fra referansespektrum av 3,4-dihydroksybenzoesyre. Referansen har også brukt deuterert metanol som løsningsmiddel.

H/C nummer	$^{13}\text{C}$ -NMR referansedata (ppm) (Scott, 1972)	$^{13}\text{C}$ -NMR E1.2.2.7 (ppm)
C1	122,4	123,1
C2	117,5	117,7
C3	145,3	146,1
C4	150,8	151,5
C5	115,7	115,7
C6	123,9	123,9
C1'	169,4	170,2

Tabell 6-14: Sammenligning av observerte  $^1\text{H}$ -NMR data for 3,4-dihydroksybenzosyre med data fra referansespektrum av 3,4-dihydroksybenzosyre. Referansen har brukt  $\text{DMSO-d}_6$  som løsningsmiddel.

H/C nummer	$^1\text{H}$ -NMR referansedata (ppm) (Zhang et al., 1998)	$^1\text{H}$ -NMR E1.2.2.7 (ppm)
H-1	-	-
H-2	7,33 d ( $J = 1,8$ Hz)	7,43 m (overlappende signaler)
H-3	-	-
H-4	-	-
H-5	6,79 d ( $J = 8,5$ Hz)	6,79 dd ( $J=1,4$ Hz og 7,1 Hz)
H-6	7,28 dd ( $J = 8,5$ Hz og 1,8 Hz)	7,42 m (overlappende signaler)
H-1'	-	-

### 6.1.7 3,4-Dihydroksybenzosyre

#### Bioassay

#### DPPH-scavenging

Assay for radikalscavenging (DPPH-test) ble utført på kommersiell 3,4-dihydroksybenzosyre. Resultatene er vist i Tabell 6-15.

Tabell 6-15: DPPH-test på 3,4-dihydroksybenzosyre.

Ekstrakt	Kons. mg/ml	Kons. i kyvette ( $\mu\text{g/ml}$ )	Scavengerakt. (%)	SD ( $\pm$ )	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
3,4-dihydroksybenzosyre	1,25	20,8	64,5	4,3	$11 \pm 2$
	0,625	10,4	47,9	2,8	

Resultatet viser at 3,4-dihydroksybenzosyre har moderat radikalscavenger aktivitet med en  $\text{IC}_{50}$ -verdi på  $71 \pm 13 \mu\text{M}$ ,  $11 \pm 2 \mu\text{g/ml}$ . Dette er konsentrasjonen av 3,4-dihydroksybenzosyre som gir 50 % hemming av DPPH.

## 15-LO

Det ble utført 15-LO test på 3,4-dihydroksybenzosyre med quercetin som positiv kontroll ( $IC_{50} = 108 \pm 2 \mu\text{M}$ ,  $11 \pm 2 \mu\text{g/ml}$ ), se tabell 6-16.

Tabell 6-16: 15-LO test på 3,4-dihydroksybenzosyre.

Ekstrakt	Kons. mg/ml	Kons. i kyvette ( $\mu\text{g/ml}$ )	% hemming	SD ( $\pm$ )	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
3,4-dihydroksy- benzosyre	5	83,3	72,5	4,3	$62 \pm 3$
	2,5	41,7	19,8	1,3	

Resultatet viser at 3,4-dihydroksybenzosyre har lav 15-LO-hemmende aktivitet med en  $IC_{50}$ -verdi på  $402 \pm 24 \mu\text{M}$ ,  $62 \pm 3 \mu\text{g/ml}$ . Dette er konsentrasjonen av 3,4-dihydroksybenzosyre som gir 50 % hemming av 15-LO.

## XO-hemming

Det ble utført XO-hemming på 3,4-dihydroksybenzosyre med quercetin som positiv kontroll ( $IC_{50} = 2,7 \pm 0,4 \mu\text{M}$ ,  $0,8 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$ ), se tabell 6-17.

Tabell 6-17: XO-test på 3,4-dihydroksybenzosyre.

Ekstrakt	Kons. mg/ml	Kons. i kyvette ( $\mu\text{g/ml}$ )	% hemming	SD ( $\pm$ )	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
3,4-dihydroksy- benzosyre	5	83,3	16,9	2,8	> 83
	2,5	41,7	-1,5	5,7	

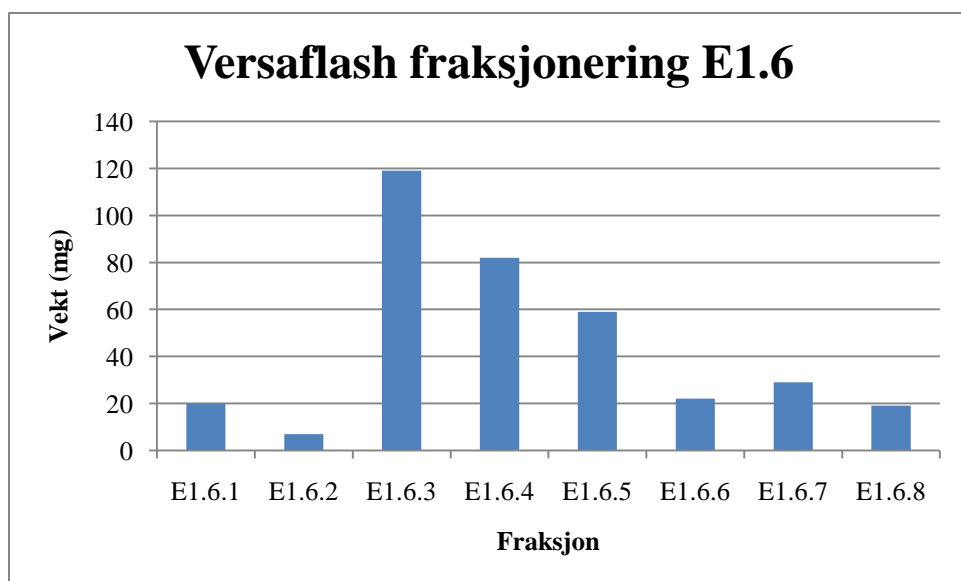
Resultatet viser at 3,4-dihydroksybenzosyre er nær inaktiv som XO-scavenger.

## 6.1.8 Videre separasjon av fraksjon E1.6

### Versaflash kolonnekromatografi

Fraksjon E1.6, 444 mg, ble separert på en versaflashkolonne, se kap 5.3.7. Det ble samlet 44 fraksjoner som på bakgrunn av analytisk TLC etterfulgt av ceric-spraying, ble slått sammen til fraksjonene E1.6.1-E1.6.8. Det samlede utbyttet av fraksjoneringen ble 357 mg (80 %). Figur 6-6 viser vekt av fraksjonene.





Figur 6-6: Vekt av fraksjoner fra separasjon av E1.6 på versaflashkolonne.

### NMR-spektroskopi

$^1\text{H}$ -NMR-spektra til fraksjon E1.6.1 til E1.6.6 viser mange signaler i aromat- og olefinområdet, som tyder på komplekse blandinger. Alle fraksjonene inneholder fortsatt mye forurensninger, fett og karbohydrater, og det er vanskelig å tyde spektrene.

Fraksjon E1.6.4 er mest interessant, og har minst forurensning. Denne fraksjonen blir prioritert videre ut i fra NMR-spektra.

### 6.1.9 Videre separasjon av fraksjon E1.6.4

#### HPLC

Fraksjon E1.6.4, 82 mg, ble separert og fraksjonert på en  $\text{C}_{18}$  preparativ omvendtfase HPLC kolonne, se kap 5.3.8. På bakgrunn av absorbans ved 280 nm registrert i kromatogrammet og analytisk HPLC ble det dampet inn fraksjoner som var interessante. Dessverre er de fleste fraksjonene ganske små (under 10 mg). Kun fraksjon E1.6.4.3 og E1.6.4.4 veier henholdsvis 22 mg og 16 mg.

### NMR-spektroskopi

$^1\text{H}$ -NMR-spektra viser mange fraksjoner som fortsatt er veldig urene og inneholder mange forurensninger. Fraksjon E1.6.4.1 er nesten tom og inneholder kun litt fett og løsningsmidler.

Alle de andre fraksjonene viser interessante signaler i aromat- og olefinområdet, men de fleste spektrene ser kompliserte ut.

Fraksjon E1.6.4.3 viser en del signaler i karbohydratområdet 3-4.5 ppm. I olefin og aromatområdet ser vi 3 skarpe signaler ved 6,59 ppm, 6,92 ppm og 7,85 ppm som alle ser ut til å være dubletter og integrere for 1-H hver. I området 1-1,5 ppm ser man en dublett ved 1,45 ppm og ellers kun fett og andre forurensninger. Etter vurdering av spektrene ble det bestemt å fraksjonere E1.6.4.3 videre fordi den er renest og den største fraksjonen.

### **6.1.10 Videre separasjon av fraksjon E1.6.4.3**

#### **HPLC**

Fraksjon E1.6.4.3, 22 mg, ble separert og fraksjonert på en C<sub>18</sub> preparativ omvendtfase HPLC kolonne, se kap 5.3.9. På bakgrunn av absorbans ved 280 nm registrert i kromatogrammet og analytisk HPLC ble det dampet inn en fraksjon som var interessant, E1.6.4.3.8 (13 mg).

#### **NMR-spektroskopi**

<sup>1</sup>H-NMR-spektret for E1.6.4.3.8 viser at det ikke har hjulpet noe særlig å kjøre fraksjonen på preparativ HPLC. Spektret ser nesten helt likt ut som spektret for E1.6.4.3, bare litt renere i karbohydratområdet og grunnlinja har litt mindre støy.

#### **Videre arbeid**

Selv om den siste opprensingen av E1.6.4.3 ikke har gitt så mye renere NMR-spekter, gjøres et nytt forsøk med fraksjon E1.6.4.3.8 for å se om det blir renere.

### **6.1.11 Videre separasjon av fraksjon E1.6.4.3.8**

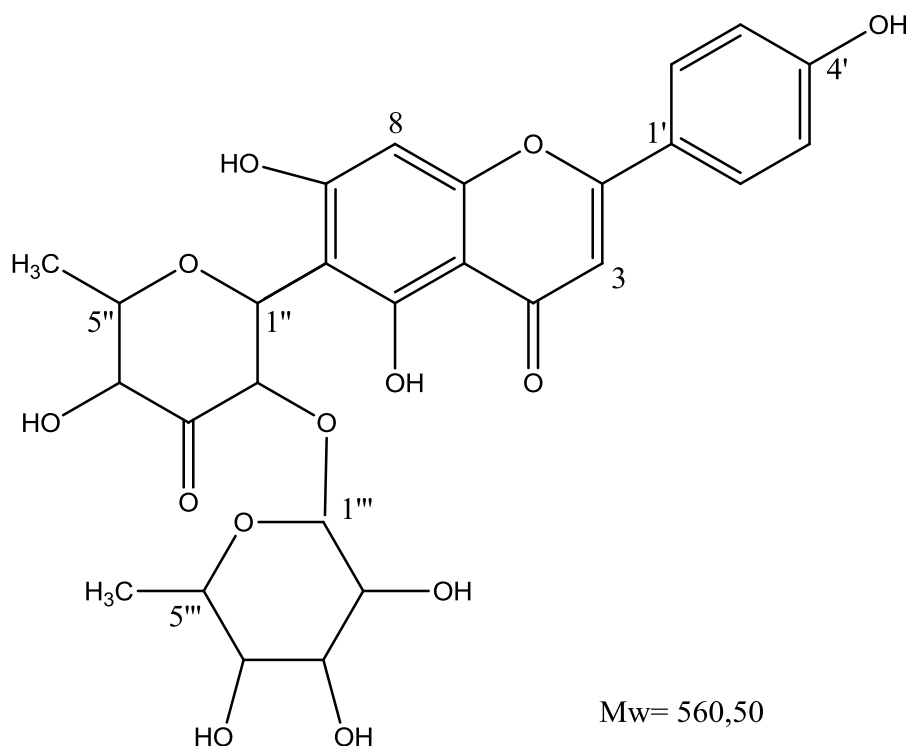
#### **HPLC**

Fraksjon E1.6.4.3.8 ble separert og fraksjonert på en C<sub>18</sub> semipreparativ HPLC kolonne, se kap 5.3.10. På bakgrunn av absorbans ved 280 nm registrert i kromatogrammet og analytisk HPLC ble det dampet inn en fraksjon som var interessant, E1.6.4.3.8.7 (9 mg).

#### **NMR-spektroskopi**

Det ble tatt <sup>1</sup>H-NMR-, APT-, HSQC-, HMBC- og COSY-spektra av E1.6.4.3.8.7 (NMR-spektra 13-17, s. 138-140). Ut fra spektraldata og sammenligning med litteraturdata ble det

vist at både fraksjon E1.6.4.3.8.7 og fraksjon E4-5.2.5.4 (se kap 6.1.15) er cassiaoccidentalinalin A (6-[6-deoxy- $\alpha$ -L-mannopyranosyl]- $\beta$ -L-ribo-hexopyranos-3-ulos-1-yl]-apigenin), se struktur figur 6-7. NMR-dataene for isolert cassiaoccidentalinalin A og NMR litteraturdata for cassiaoccidentalinalin A er vist i henholdsvis tabell 6-18 og tabell 6-19. På grunn av en rotasjonsbarriere rundt C-glykosid bindingen får noen karbonkjerner to kjemisk skiftverdier (major og minor rotamer). Dette er presisert i tabell 6-19. Figur 6-8 viser struktur av cassiaoccidentalinalin A der det er tegnet inn piler som viser COSY- og HMBC-korrelasjoner. I litteraturen er det brukt deuterert DMSO, mens vi har brukt deuterert metanol som NMR-løsemiddel. Cassiaoccidentalinalin A er svært lite undersøkt og dette var den eneste kilden vi fant med NMR-data.



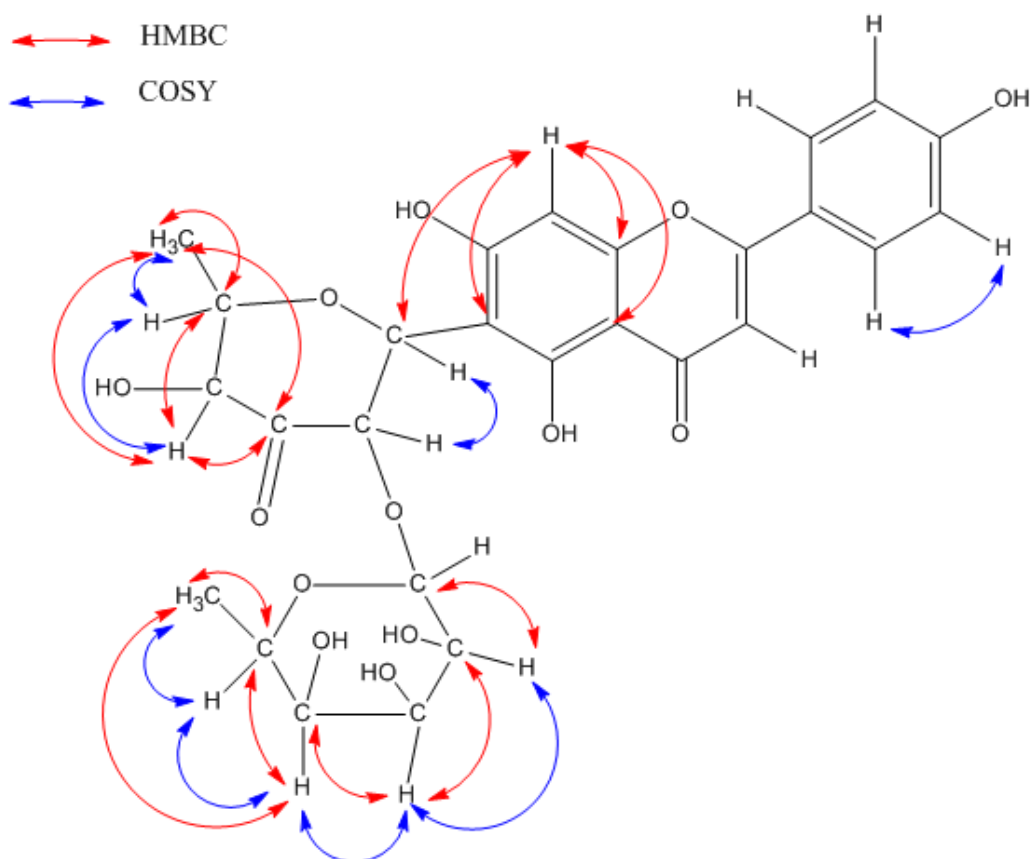
Figur 6-7: Molekylstruktur av cassiaoccidentalinalin A.

Tabell 6-18: NMR data for isolert cassiaoccidentalinalin A.

E1.6.4.3.8.7			E4-5.2.5.4	
H/C nummer	<sup>1</sup> H-NMR	<sup>13</sup> C-NMR	<sup>1</sup> H-NMR	<sup>13</sup> C-NMR
2		166,3		166,3
3	6,63 s	104,0	6,63 s	104,0
4		184,2		184,2
5		162,1		
6		109 (HMBC)		109 (HMBC)
7		163 (HMBC)		164 (HMBC)
8	6,53 s	95 (HSQC)	6,54 s	95 (HSQC)
9		159,0		159,1
10		105 (HMBC)		105 (HMBC)
1'		123,1		123,1
2',6'	7,86 d (J=8,8 Hz)	129,5	7,86 d (J=8,8 Hz)	129,5
3',5'	6,94 d (J=8,8 Hz)	117,1	6,94 d (J=8,8 Hz)	117,1
4'		162,8		162,9
1''	5,05 d (J=9,8 Hz)	75,2	5,05 d (J=9,8 Hz)	75,4
2''	5,36, 5,49 (HSQC)	77,3	5,36, 5,49 (HSQC)	77,3
3''		207,6		207,6
4''	4,04 d (J=9,3 Hz)	79,7	4,04 d (J=9,4 Hz)	79,7
5''	3,49 m	80,3	3,49 m	80,3
6''	1,44 (J=6,0 Hz)	19,2	1,44 (J=6,0 Hz)	19,2
1'''	4,86 (under MeOH)	100,8	4,86 (under MeOH)	100,8
2'''	3,97 dd	71,8	3,97 dd	71,8
3'''	3,30 m	72,0	3,30 m	72,0
4'''	3,16 t (J=9,3 Hz)	73,2	3,16 t (J=9,4 Hz)	73,2
5'''	2,57 m	70,3	2,57 m	70,3
6'''	0,83, 0,97 s (HSQC)	17,9	0,83, 0,97 s (HSQC)	17,9

Tabell 6-19: NMR litteraturdata for cassiaoccidentalinalin A (Hatano et al., 1999). (Major (mj) og minor (mi) rotamer).

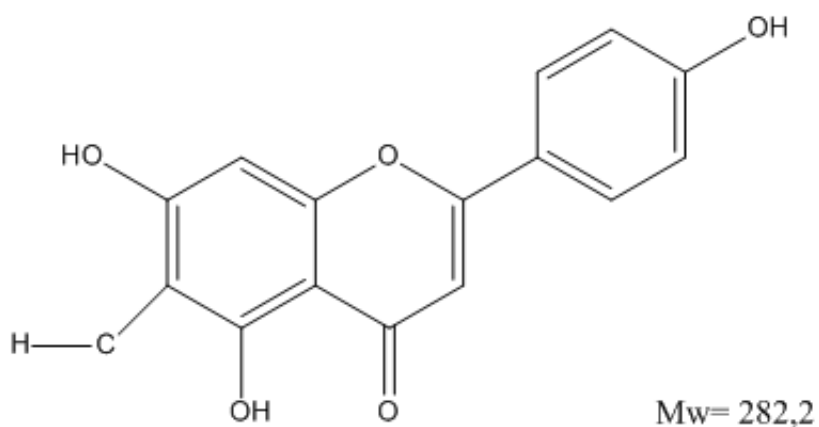
	<sup>1</sup> H-NMR	<sup>13</sup> C-NMR
2		163,9
3	6,72 1H brs	103,3
4		182,4
5		161,1
6		107,8
7		162,3
8	6,53 1H s	93,5
9		156,9
10		103,1
1'		121,4
2',6'	7,88 2H d (J=9 Hz)	128,8
3',5'	6,92 2H d (J=9 Hz)	116,3
4'		161,3
6-deoxy-ribo-hexos-3-ulose		
1''	4,84 1H d (J=10 Hz)	73,6
2''	5,22 (mi) 5,27 (Mj) br d (10)	75,8
3''		206,2
4''	3,88 d (10)	78,2
5''	3,37 m	78,4
6''	1,29 3H d (J=6 Hz)	19,2
Rhamnose		
1'''	4,64 1H brs	99,5
2'''	3,69 brm	70,4
3'''	3,02 m	70,3
4'''	2,95 t (9,5)	71,4
5'''	2,34 (Mj) 2,41 (mi) m	69,1
6'''	0,67 (mi) 0,78 (mi) 3H total brs	17,6



Figur 6-8: Struktur av cassiaoccidentalinal A med piler som viser COSY- og HMBC-korrelasjoner.

### Massespektrometri

Massespektret av fraksjon E1.6.4.3.8.7 viser to signaler, et på 558,2 og et på 282,8. Siden ES-er brukt som ioniseringsmetode, hadde vi forventet et signal på 559,5 (560,5-1). Signalet på 282,8 antas å være fra flavonskjelettet med C-glykosidisk karbon som har en molekylvekt på 282,2, se figur 6-9.



Figur 6-9: Struktur av flavonskjelettet med C-glykosidisk karbon.

## Bioassay

### DPPH-scavenging

Assay for radikalscavenging (DPPH-test) ble utført på isolert cassiaoccidentalinalin A.

Resultatene er vist i tabell 6-20.

Tabell 6-20: DPPH-test på cassiaoccidentalinalin A.

Ekstrakt	Kons. mg/ml	Kons. i kyvette (µg/ml)	Scavengerakt. (%)	SD (±)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
Cassiaoccidentalinalin A	2,5	41,7	17,7	1,0	> 42

Resultatet viser at cassiaoccidentalinalin A er en dårlig radikalscavenger.

### 15-LO

Det ble utført 15-LO test på isolert cassiaoccidentalinalin A med quercetin som positiv kontroll (IC<sub>50</sub> = 108 ± 2 µM, 32,6 ± 0,6 µg/ml), se tabell 6-21.

Tabell 6-21: 15-LO test på cassiaoccidentalinalin A.

Ekstrakt	Kons. mg/ml	Kons. i kyvette (µg/ml)	% hemming	SD (±)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
Cassiaoccidentalinalin A	5	83,3	101,8	1,2	63 ± 6
	3,75	62,5	49,4	2,8	
	2,5	41,7	29,6	9,2	
	1,25	20,8	9,1	4,7	

Resultatet viser at cassiaoccidentalinalin A har høy 15-LO-hemmende aktivitet med en IC<sub>50</sub>-verdi på 112 ± 9 µM, 63 ± 6 µg/ml. Dette er konsentrasjonen av cassiaoccidentalinalin A som gir 50 % hemming av 15-LO, og viser at cassiaoccidentalinalin A er omtrent jevn god som 15-LO-hemmer på molar basis med quercetin.

### XO-hemming

Det ble utført XO-hemming på isolert cassiaoccidentalinalin A med quercetin som positiv kontroll (IC<sub>50</sub> = 2,7 ± 0,4 µM, 0,8 ± 0,1 µg/ml), se tabell 6-22.

Tabell 6-22: XO-test på cassiaoccidentalin A.

Ekstrakt	Kons. mg/ml	Kons. i kyvette (µg/ml)	% hemming	SD (±)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
Cassiaoccidentalin A	5	83,3	69,5	2,2	42 ± 4
	2,5	41,7	49,7	2,6	
	1,25	20,8	35,1	1,0	

Resultatet viser at cassiaoccidentalin A er en moderat XO-scavenger med en IC<sub>50</sub>-verdi på 75 ± 6 µM, 42 ± 4 µg/ml.

### 6.1.12 Cassiaoccidentalin A

Cassiaoccidentalin A er et sjeldent C-glykosid flavonoid, som tidligere kun har blitt isolert fra den overjordiske delen av planten *Cassia occidentalis* (Leguminosae) (Hatano et al., 1999).

Det har tidligere bare blitt gjort en studie på cassiaoccidentalin A, som sier at cassiaoccidentalin A ikke undertrykker HIV promotor aktiviteten (Uchiumi et al., 2003).

En studie er blitt gjort på et stoff som ligner på cassiaoccidentalin A, 2''-O- $\alpha$ -rhamnosyl-6-C-(6-deoxy-ribo-hexos-3-ulosyl)luteolin (cassiaoccidentalin B). Den eneste forskjellen på dette stoffet og cassiaoccidentalin A, er at dette stoffet har en hydroksylgruppe i 3'-posisjon. Denne studien viser at 2''-O- $\alpha$ -rhamnosyl-6-C-(6-deoxy-ribo-hexos-3-ulosyl)luteolin har potent antioksidantaktivitet i en TEAC-test. TEAC testen sier noe om stoffets evne til å overføre radikaler. Studien sier også noe om viktigheten av antall hydroksylgrupper og særlig betydningen av en B-ring katekolgruppe for antioksidantaktiviteten (Van Hoyweghen et al., 2010).

Det som er interessant er at planten *C. occidentalis* finnes i et tradisjonelt legemiddel i Mali som brukes mot malaria, se figur 6-10. Dette kan styrke grunnlaget for hvorfor så mange healere i Mali bruker *B. petersianum* mot malaria.



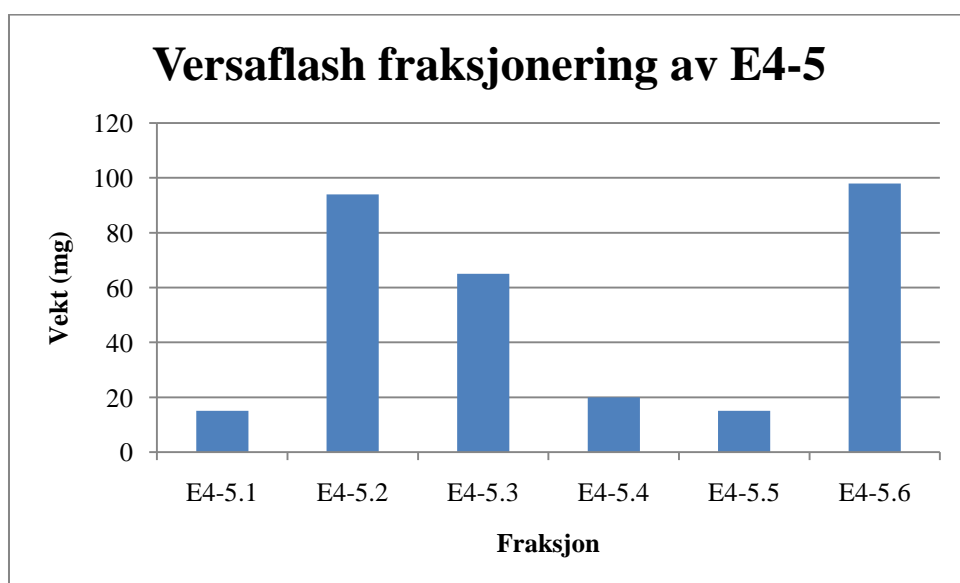


Figur 6-10: Bilde av Malarial, tradisjonelt legemiddel i Mali mot malaria

### 6.1.13 Videre separasjon av fraksjon E4-5

#### Versaflash kolonnekromatografi

Fraksjon E4-5, 395 mg, ble separert på en versaflashkolonne, se kap 5.3.11. Det ble samlet 42 fraksjoner som på bakgrunn av analytisk TLC etterfulgt av ceric-spraying, ble slått sammen til fraksjonene E4-5.1 til E4-5.6. Det samlede utbyttet av fraksjoneringen ble 307 mg (78 %). Figur 6-11 viser vekt av fraksjonene.



Figur 6-11: Vekt av fraksjoner fra separasjon av E4-5 på versaflashkolonne.

## NMR-spektroskopi

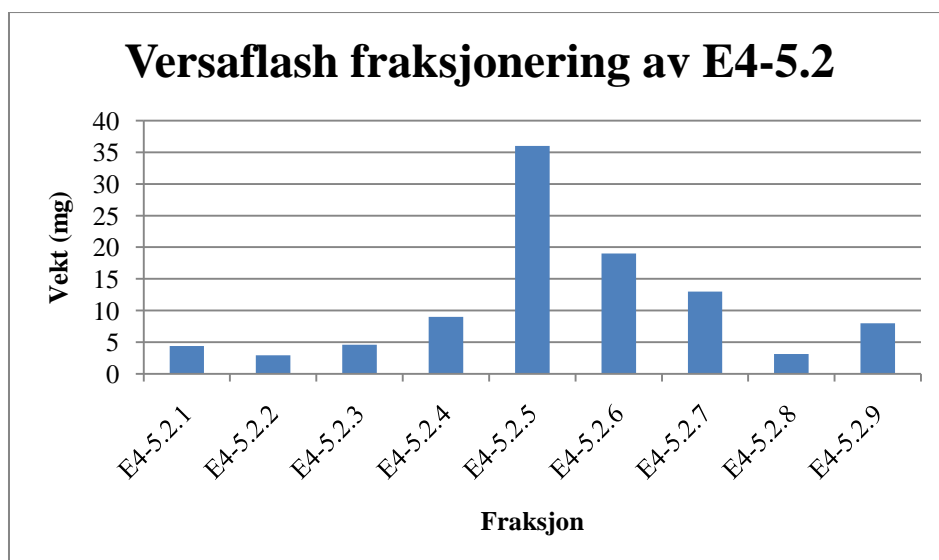
$^1\text{H}$  NMR-spektra til fraksjon E4-5.1 og E4-5.5 ser ganske kompliserte ut, og må være en blanding av mange stoffer.  $^1\text{H}$ -NMR-spektret til fraksjon E4-5.6 ser uinteressant ut, da det ikke viser noen signaler i aromatområdet. Vi ser kun signaler for vann (4,89 ppm), metanol (3,33 ppm) og fett (rundt 1,3 ppm).

$^1\text{H}$  NMR-spektra til fraksjon E4-5.2, E4-5.3 og E4-5.4 ser noe mindre komplisert ut enn spektra til fraksjon E4-5.1 og E4-5.5.  $^1\text{H}$  NMR-spektret til fraksjon E4-5.2 viser hovedsakelig fire brede toppler i aromatområdet 6,5-8 ppm. Fra 3-4 ppm er det mange signaler, og disse tyder på karbohydrater. Det er også mange signaler i området 0,5-3 ppm som kommer fra alifatiske protoner fra blant annet fett (0,88 ppm og 1,29 ppm).  $^1\text{H}$ -NMR-spektra til fraksjon E4-5.3 og E4-5.4 viser noe av det samme som fraksjon E4-5.2 i alifat- og aromatområdet, men mindre karbohydrater. Fraksjon E4-5.3 og E4-5.4 har begge et skarpt signal ved 3,64 ppm som kan være fra en metoksygruppe. Dette signalet er ikke like sterkt i fraksjon E4-5.2. Ut i fra spektrene blir fraksjon E4-5.2, E4-5.3 og E4-5.4 prioritert for videre fraksjonering.

### 6.1.14 Videre separasjon av fraksjon E4-5.2

#### Versaflash kolonnekromatografi

Fraksjon E4-5, 94 mg, ble separert på en versaflashkolonne, se kap 5.3.12. Det ble samlet 47 fraksjoner som på bakgrunn av analytisk TLC etterfulgt av ceric-spraying, ble slått sammen til fraksjonene E4-5.2.1 til E4-5.2.9. Figur 6-12 viser vekt av fraksjonene.



Figur 6-12: Vekt av fraksjoner fra separasjon av E4-5.2 på versaflashkolonne.

Utbyttet av separasjonen ble på 100 mg (106 %). Grunnen til at utbyttet ble over 100 % kan være at stoffer som satt igjen i kolonnen fra tidligere bruk og/eller kolonnemateriale kan ha blitt eluert ut sammen med E4-5-fraksjonene. Det høye utbyttet kan også skyldes at fraksjonene fra E4-5 ikke var helt tørre ved innveining, og løsemiddelrester kan ha bidratt til ekstra tyngde. Det at stoffmengden på noen av fraksjonene er lav kan også øke veieusikkerheten.

### **NMR-spektroskopi**

<sup>1</sup>H-NMR-spektra til fraksjon E4-5.2.1-E4-5.2.4 og E4-5.2.8 viser alle komplekse signaler som indikerer flere stoffer i blanding. Spektra har også mye støy på grunn av lite stoff. <sup>1</sup>H-NMR-spektret til fraksjon E4-5.2.9 tyder på at fraksjonen ikke inneholder annet enn løsningsmidler, fett og kolonnemateriale.

<sup>1</sup>H-NMR-spektra til fraksjon E4-5.2.5, E4-5.2.6 og E4-5.2.7 ser renere ut enn de andre fraksjonene fra E4-5.2. Alle de tre relativt rene fraksjonene viser hovedsakelig samme topper som i fraksjon E4-5.2, se "NMR-spektroskopi" kap 1.6.13, men toppene har blitt smalere.

### **Videre arbeid**

Fraksjon E4-5.2.5, E4-5.2.6 og E4-5.2.7 prioriteres til videre separasjon og opprensing da de er renest av E4-5.2 fraksjonene og veier mest.

#### **6.1.15 Videre separasjon av fraksjon E4-5.2.5**

##### **HPLC**

Fraksjon E4-5.2.5, 36 mg, ble separert og fraksjonert på en C<sub>18</sub> preparativ HPLC kolonne, se kap 5.3.13. På bakgrunn av absorbans ved 280 nm registrert i kromatogrammet og analytisk HPLC ble det dampet inn fem fraksjoner, der den største fraksjonen veide 11,8 mg og den minste fraksjonen veide 1 mg.

### **NMR-spektroskopi**

<sup>1</sup>H-NMR-spektret til fraksjon E4-5.2.5.4 (NMR-spektrum 18, s. 140) viser helt likt spekter som til fraksjon E1.6.4.3.8.7. Det ble også tatt <sup>13</sup>C-NMR-, HSQC- og HMBC-spektra av E4-5.2.5, se NMR-data i tabell 6-18. På bakgrunn av spektrene ser fraksjonene ut til å inneholde

det samme stoffet, cassiaoccidentalinalin A, se NMR litteraturdata tabell 6-19, og ble derfor slått sammen og kalt isolert cassiaoccidentalinalin A, se kap 1.6.11.

Fraksjon E4-5.2.5.5 (NMR-spektrum 19, s. 141) er mye renere enn fraksjon E4-5.2.5.1-E4-5.2.5.3, og viser en dublett ved 7,89 ppm, en dublett ved 6,94 ppm og en dublett ved 6,69 ppm. Spektret til E4-5.2.5.5 viser også en dobbel dublett ved 5,54 ppm, en multipllett i området 2,7 ppm og en høy topp ved 1,73 ppm. Signalene ved 6,94 ppm og 7,89 ppm er tidligere sett i andre fraksjoner, se tabell 6-18, og kommer fra henholdsvis 3',5' og 2',6' protonene i flavonskjelettet. Den høye toppen ved 1,73 ppm kan komme fra en metoksygruppe.

<sup>1</sup>H-NMR-spektra til fraksjon E4-5.2.5.2 og E4-5.2.5.3 er nesten helt like. Spektrene er mer kompliserte enn de andre fraksjonene i E4-5.2.5, og viser flere signaler i karbohydratområdet (3-4 ppm) og mer fett og forurensning i alifatområdet (0,5-2,5 ppm). I aromat- og olefinområdet viser spektrene tre multipler (7,86 ppm, 6,92 ppm og 6,59 ppm) og en singlett (7,38 ppm).

<sup>1</sup>H-NMR-spektret til fraksjon E4-5.2.5.1 viser tre multipler i aromat- og olefinområdet, men her er signalet ved 7,8 ppm som er sett i de fire andre spektrene nesten helt borte.

Ingen av fraksjonene ble fraksjonert videre da de var for små og NMR-spektra for kompliserte for videre opprensning.

#### **6.1.16 Videre separasjon av fraksjon E4-5.2.6**

##### **HPLC**

Fraksjon E4-5.2.6, 19 mg, ble separert og fraksjonert på en C<sub>18</sub> preparativ HPLC kolonne, se kap 5.3.15. På bakgrunn av absorbans ved 280 nm registrert i kromatogrammet og analytisk HPLC ble det dampet inn fire fraksjoner, der den største fraksjonen veide 2,8 mg og den minste fraksjonen veide 1,4 mg.

## **NMR-spektroskopi**

<sup>1</sup>H-NMR-spektra til fraksjon E4-5.2.6.2-E4-5.2.6.4 viser alle lignende signaler i aromat- og olefinområdet som i spektret til fraksjon E4-5.2.5.5, se kap "NMR-spektroskopi" kap 1.6.15.

<sup>1</sup>H-NMR-spektret til fraksjon E4-5.2.6.1 viser at denne fraksjonen er renest av E4-5.2.6-fraksjonene, og har fire signaler i aromat- og olefinområdet som ligner på signalene i spektret til fraksjon E4-5.2.5.4, se tabell 6-18 for NMR data.

Ingen av fraksjonene ble fraksjonert videre da de var for små og NMR-spektra for kompliserte for videre opprensing.

### **6.1.17 Videre separasjon av fraksjon E4-5.2.7**

#### **HPLC**

Fraksjon E4-5.2.7, 13 mg, ble separert og fraksjonert på en C<sub>18</sub> preparativ HPLC kolonne, se kap 5.3.16. På bakgrunn av absorbans ved 280 nm registrert i kromatogrammet og analytisk HPLC ble det dampet inn to fraksjoner på ca 2 mg hver.

## **NMR-spektroskopi**

<sup>1</sup>H-NMR-spektret til fraksjon E4-5.2.7.1 (NMR-spektrum 20, s. 141) viser signaler i aromat- og olefinområdet som ligner på fraksjon E4-5.2.5.4, se tabell 6-18 for NMR data. I tillegg har fraksjon E4-5.2.7 to dubletter i dette området som ikke finnes i spektret til fraksjon E4-5.2.5.4. Disse dublettene viser signaler ved 6,35 ppm (J=12,5 Hz) og 7,62 ppm (J=12,6 Hz).

<sup>1</sup>H-NMR-spektret til fraksjon E4-5.2.7.2 viser mye støy, men man ser signaler i aromat- og olefinområdet som ligner på de andre fraksjonene fra E4-5.

På grunn av for lite stoff ble det ikke gjort noe mer med disse fraksjonene.

### **6.1.18 Videre separasjon av fraksjon E4-5.3**

#### **HPLC**

Fraksjon E4-5.3, 65 mg, ble separert og fraksjonert på en C<sub>18</sub> preparativ HPLC kolonne, se kap 5.3.17. På bakgrunn av absorbans ved 280 nm registrert i kromatogrammet og analytisk

HPLC ble det dampet inn fem fraksjoner, der den største fraksjonen veide 6,3 mg og den minste fraksjonen veide 1,7 mg.

### **NMR-spektroskopi**

$^1\text{H}$ -NMR-spektra til fraksjon E4-5.3.1 og E4-5.3.2 viser tre små signaler i aromat- og olefinområdet som tyder på flavonoidstruktur, men ellers mye fett og forurensning.

$^1\text{H}$ -NMR-spektra til fraksjon E4-5.3.3 og E4-5.3.4 inneholder mange komplekse signaler i aromat- og olefinområdet og indikerer en blanding av flere stoffer.

Ut fra  $^1\text{H}$ -NMR-spektret til E4-5.3.5 (NMR-spektrum 21, s. 142) kan det se ut som det foreligger et apigeninderivat substituert i posisjon 6 eller 8. Dette ses ut fra dubletter (2H hver,  $J=8,4$  Hz) ved 6,93 ppm og 7,88 ppm, som kan komme fra B-ring protonene H-3',5' og H-2',6'. To singletter (1H hver) ses ved 6,67 ppm og 6,69 ppm, og kan komme fra H-3 og H-6 eller H-8. Et signal ved 5,54 ppm (1H, dd,  $J=3,0$  Hz og 9,9 Hz) er ikke tilordnet. Singletter ved 3,73 ppm og 3,65 ppm kan komme fra aromatiske metoksylder. Ved 1,72 ppm er det også en singlett som kan komme fra en metoksylder. Det ser ikke ut som stoffet er glykosylert. Et stort antall signaler ved 0,9-4,5 ppm tyder på at stoffet er svært urent.

Fraksjon E4-5.3.5 blir prioritert for videre separasjon da det er interessant, men fortsatt inneholder fett og andre forurensninger som gjør spektret vanskelig å tolke.

### **6.1.19 Videre separasjon av fraksjon E4-5.3.5**

#### **HPLC**

Fraksjon E4-5.3.5, 3,7 mg, ble separert og fraksjonert på en  $\text{C}_{18}$  semipreparativ HPLC kolonne, se kap 5.3.18. På bakgrunn av absorbans ved 280 nm registrert i kromatogrammet og analytisk HPLC ble det dampet inn to fraksjoner, på 0,9 mg og 1,0 mg.

#### **NMR-spektroskopi**

$^1\text{H}$ -NMR-spektret til fraksjon E4-5.3.5.7 viser at denne fraksjonen for det meste inneholder fett og løsningsmidler, og er uinteressant.

<sup>1</sup>H-NMR-spektret til fraksjon E4-5.3.5.6 (NMR-spektrum 22, s. 142) viser hovedsakelig det som tidligere er observert i fraksjon E4-5.3.5, se NMR-spektroskopi kap 1.6.18.

Sammenlignet med spektret til fraksjon E4-5.3.5 viser dette spektret mye mindre fett og forurensninger i området 0-3 ppm. I aromat- og olefinområdet har singletten ved 5,71 ppm blitt borte, det tyder på at dette bare var en forurensning.

### **Videre arbeid**

Fraksjon E4-5.3.5.6 slås sammen med fraksjon E4-5.4.4, se kap 1.6.21.

## **6.1.20 Videre separasjon av fraksjon E4-5.4**

### **HPLC**

Fraksjon E4-5.4, 20 mg, ble separert og fraksjonert på en C<sub>18</sub> semipreparativ HPLC kolonne, se kap 5.3.19. På bakgrunn av absorbans ved 280 nm registrert i kromatogrammet og analytisk HPLC ble det dampet inn fire fraksjoner, der den største fraksjonen veide 2,8 mg og den minste fraksjonen veide 1,4 mg.

### **NMR-spektroskopi**

<sup>1</sup>H-NMR-spektra til fraksjon E4-5.4.1 og E4-5.4.2 viser at fraksjonene er uinteressante, mens fraksjon E4-5.3 viser et komplisert spekter som indikerer en blanding av flere stoffer.

<sup>1</sup>H-NMR-spektret til fraksjon E4-5.4.4 viser samme signaler som spektret til fraksjon E4-5.3.5.6, se "NMR-spektroskopi" kap 1.6.19.

## **6.1.21 Videre arbeid med fraksjon E4-5.3.5.6 og E4-5.4.4**

### **Sammenslåing**

Fraksjon E4-5.3.5.6 og E4-5.4.4 slås sammen til fraksjon E4-5A da <sup>1</sup>H-NMR-spektra til fraksjonene viser at de inneholder samme stoff.

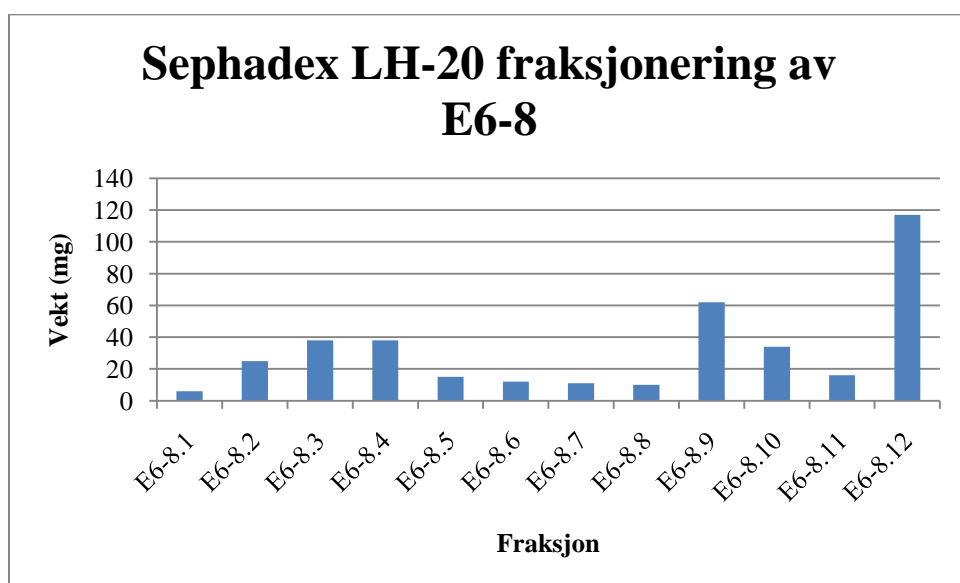
### **NMR-spektroskopi**

<sup>13</sup>C-NMR-spektret til E4-5A er uinteressant, da det viste seg at det ikke var nok stoff til å gi et bra spekter.

### 6.1.22 Videre separasjon av fraksjon E6-8

#### Sephadex LH-20 kolonnekromatografi

Fraksjon E6-8, 254 mg, ble separert og fraksjonert på en Sephadex LH-20 kolonne, se kap 5.3.21. Det ble tilsammen samlet 34 fraksjoner som på bakgrunn av analytisk TLC etterfulgt av ceric-spraying, ble slått sammen til fraksjonene E6-8.1 til E6-8.12. Figur 6-13 viser vekt av fraksjonene.



Figur 6-13: Vekt av fraksjoner fra separasjon av E6-8 på Sephadex-kolonne.

Utbyttet av separasjonen ble på 384 mg (151 %). Grunnen til at utbyttet ble over 100 % kan være at den siste mobilfasen som ble brukt var aceton:vann (70:30) etterfulgt av vasking av kolonnen med 100 % metanol. Aceton har kraftig løsemiddelstyrke og kan ha eluert ut stoffer fra tidligere bruk. Dette er sannsynlig da siste fraksjon, E6-8.12, var på 117 mg, altså 46 % av utbyttet. For mulige grunner til at utbyttet ble over 100 %, se kap 6.1.14 ”versafash kolonnekromatografi”.



## NMR-spektroskopi

$^1\text{H}$ -NMR-spektra til fraksjon E6-8.1 til E6-8.4 er uinteressante da de viser lite signaler i aromat- og olefinområdet.

$^1\text{H}$ -NMR-spektra til fraksjon E6-8.5 til E6-8.12 viser alle signaler i aromat- og olefinområdet, men også karakteristiske signaler for ftalat (7,6-7,7 ppm, 4,2 ppm og signaler i alifatområdet som overlapper med fett).

## Videre arbeid

Ut fra  $^1\text{H}$ -NMR-spektra ble det bestemt å fraksjonere E6-8.10 og E6-8.11 videre i håp om å fjerne ftalat og få et rent stoff. Grunnen til at disse ble valgt er fordi de inneholder flest signaler i aromat- og olefinområdet.

### 6.1.23 Videre separasjon av fraksjon E6-8.10

#### HPLC

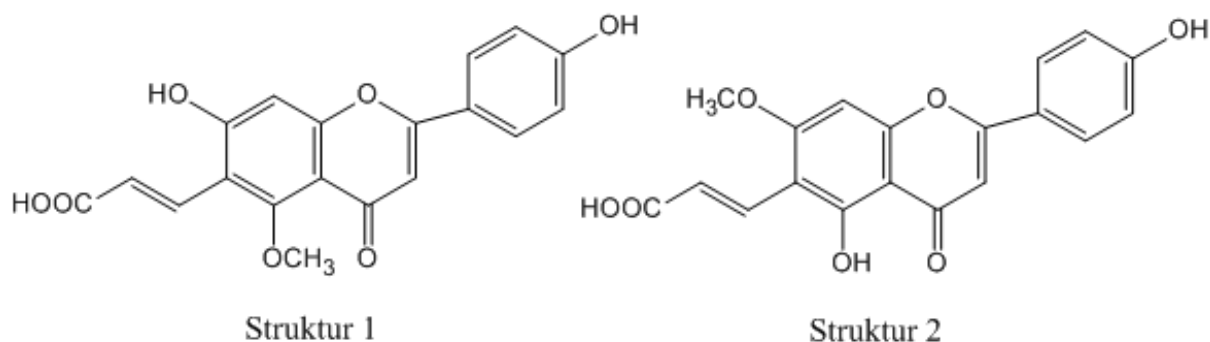
Fraksjon E6-8.10, 34 mg, ble separert og fraksjonert på en  $\text{C}_{18}$  preparativ HPLC kolonne, se kap 5.3.22. På bakgrunn av absorbans ved 280 nm registrert i kromatogrammet og analytisk HPLC ble det dampet inn fire fraksjoner, E6-8.10.1 til E6-8.10.4. Disse fraksjonene veide fra 3,6-6,1 mg.

## NMR-spektroskopi

$^1\text{H}$ -NMR-spektra av alle fire fraksjoner er interessante og viser signaler i aromat- og olefinområdet. Alle fraksjonene har signalet 6,52 ppm, som i tidligere fraksjoner har vist seg å være fra H-8 i flavonskjelettet, se NMR data tabell 6-18. De har også signaler ved 6,9 ppm og 7,8 ppm, som henholdsvis er fra H-3',5' og H-2',6' i B-ringene. Signalet rundt 6,64 ppm som har vist å være fra H-3 i C-ringene ser man i tre fraksjoner, men ikke i fraksjon E6-8.10.2. Tre av fraksjonene har et signal ved 3,7 ppm, som fraksjon E6-8.10.3 ikke har. Dette signalet kan muligens være fra en metoksygruppe, men det er usikkert hvor den sitter på flavonet.

Fraksjon E6-8.10.1 er renest av disse fraksjonene (NMR-spektrum 23, s. 143), og NMR-dataene tyder på at fraksjonen er et flavon med C3 sidekjede. Det er usikkert om metoksygruppen sitter i C5 eller C7, og mulige strukturer er vist i figur 6-14. Tabell 6-23

viser NMR data for E6-8.10.1, og tabell 6- 24 viser NMR referanse for flavoner med C3 sidekjede.



Figur 6-14: Strukturer av flavon med C3 sidekjede. Metoksygruppen sitter på C5 (struktur 1) eller C7 (struktur 2).

Tabell 6-23:  $^1\text{H}$ -NMR data for fraksjon E6-8.10.1

H nummer	$^1\text{H}$ -NMR
2	
3	6,64 s
4	
5	
6	
7	
8	6,51 s
9	
10	
1'	
2',6'	7,85 d (J=8,4 Hz)
3',5'	6,93 d (J=8,3 Hz)
4'	
1''	8,07 d (J=16,3 Hz)
2''	6,96 d (J=16,2 Hz)
3''	
OCH <sub>3</sub>	3,77 s

Tabell 6-24: NMR referanser for flavoner med C3 sidekjede, demetyltorosaflavon D (Kitanaka og Takido, 1992) og luteolin 8-C-E-propensyre (Zhao et al., 2007).

Demetyltorosaflavon D			Luteolin 8-C-E-propensyre		
Løst i DMSO-d <sub>6</sub>		6-C3	Løst i CD <sub>3</sub> OD		8-C3
H/C nummer	<sup>1</sup> H-NMR	<sup>13</sup> C-NMR	H/C nummer	<sup>1</sup> H-NMR	<sup>13</sup> C-NMR
2		163,9	2		165
3	6,77 s	102,7	3	6,72 s	104,2
4		181,8	4		182,2
5		161,7	5		162,5
6		105,7	6	6,34 s	99,3
7		163,3	7		164,7
8	6,57 s	93,5	8		102,3
9		157,9	9		156,3
10		103,2	10		104,4
1'		121,1	1'		122,3
2'	7,42 d (J=2,4 Hz)	113,3	2'	7,36 s	114,3
3'		145,7	3'		146,4
4'		149,8	4'		150,3
5'	6,91 d (J=8,8 Hz)	116	5'	6,92 d (J=8,8 Hz)	116,4
6'	7,46 dd (J=8,8 Hz, 2,4 Hz)	119,1	6'	7,38 d (J=8,8 Hz)	119,4
1''	7,90 d (J=16,1 Hz)	133,6	1''	8,00 d (J=16,0 Hz)	133,4
2''	6,84 d (J=16,1 Hz)	119,9	2''	6,80 d (J=16,0 Hz)	120,2
3''		168,6	3''		169

#### 6.1.24 Videre separasjon av fraksjon E6-8.11

##### HPLC

Fraksjon E6-8.11 ble separert og fraksjonert på en C<sub>18</sub> preparativ HPLC kolonne. På bakgrunn av absorbans ved 280 nm registrert i kromatogrammet og analytisk HPLC ble det dampet inn seks fraksjoner.

##### NMR-spektroskopi

<sup>1</sup>H-NMR-spektra av de seks fraksjonene viser at fire av fraksjonene inneholder stoff, og de to resterende fraksjonene var uinteressante.

## Videre arbeid

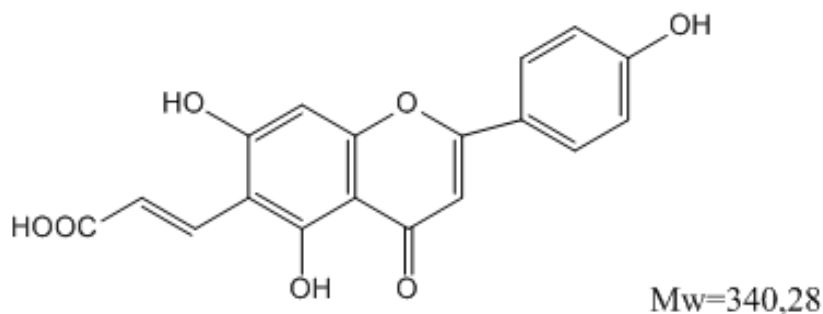
De fire fraksjonene som fra  $^1\text{H}$ -NMR-spektra viser seg å inneholde samme stoff ble slått sammen til fraksjonen E6-8.11.1-4 for å få mer stoff. Denne fraksjonen ble rensset opp videre.

### 6.1.25 Videre separasjon av fraksjon E6-8.11.1-4

Fraksjon E6-8.11.1-4, 3,3 mg, ble separert og fraksjonert på en  $\text{C}_{18}$  preparativ HPLC kolonne. På bakgrunn av absorbans ved 280 nm registrert i kromatogrammet og analytisk HPLC ble det dampet inn en fraksjon, E6-8.11A.

### NMR-spektroskopi

$^1\text{H}$ -NMR-spekter av fraksjon E6-8.11A (NMR-spektrum 24, s. 143) viser de samme signalene i aromat- og olefinområdet som tidligere er vist i fraksjon E6-8.10.1, se "NMR-spektroskopi" kap 1.6.23. Men i fraksjon E6-8.11A er det ingen stor topp ved 3,7 ppm som tyder på metoksygruppe. Spektraldata og sammenligning med litteraturdata tyder altså på at fraksjon E6-8.11A er apigenin 6-(2-propensyre), se figur 6-15. Dette er et nytt naturprodukt. NMR-data for apigenin 6-(2-propensyre) er vist i tabell 6-25. For referansespektrene for flavoner med C3 sidekjede se tabell 6-24.



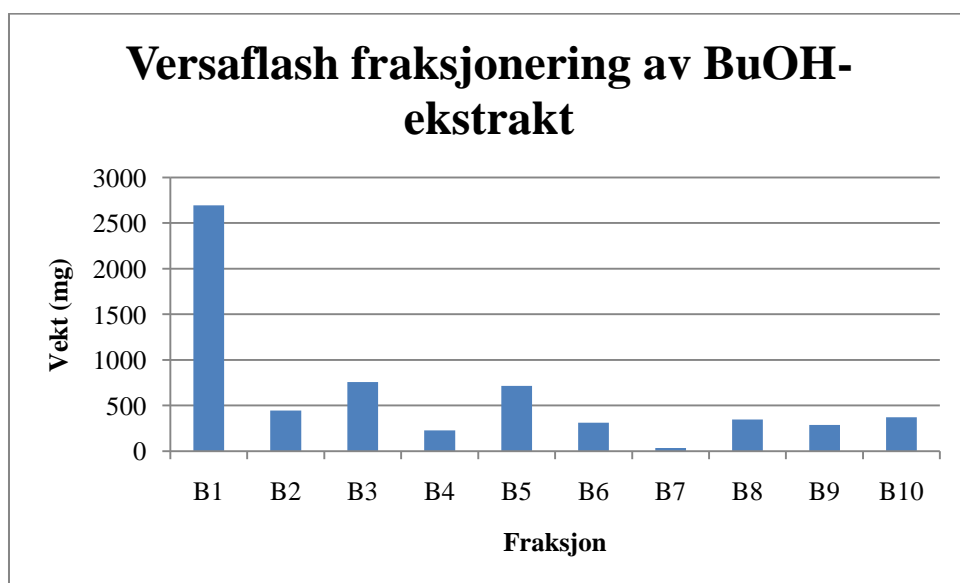
Figur 6-15: Struktur av apigenin 6-(2-propensyre).

Tabell 6-25:  $^1\text{H}$ -NMR data for fraksjon E6-8.11A

H nummer	H-NMR
2	
3	6.66 s
4	
5	
6	
7	
8	6.54 s
9	
10	
1'	
2',6'	7.86 d (J=8.6 Hz)
3',5'	6.94 d (J=8.4 Hz)
4'	
1''	8.09 d (J=16.1 Hz)
2''	6.96 d (J=16.1 Hz)
3''	

### 6.1.26 Fraksjonering av BuOH-ekstraktet

BuOH-ekstraktet, 9,42 g, ble separert på en versaflashkolonne, se kap 5.3.25. Det ble samlet 178 fraksjoner som på bakgrunn av analytisk TLC etterfulgt av ceric-spraying, ble slått sammen til fraksjonene B1-B10. Dette ga et utbytte på 6,20 g (66 %). Figur 6-16 viser vekt av fraksjonene.



Figur 6-16: Vekt av fraksjoner fra separasjon av BuOH-ekstraktet på versaflashkolonne.

## NMR-spektroskopi

<sup>1</sup>H-NMR-spektra til fraksjonene viser alle en blanding av flere stoffer. Alle spektrene viser mye fett og sukker, og varierende grad av topper i aromat- og olefinområdet. Spektra til B3-B6 er mest interessant da de viser fire brede topper i området 6-8 ppm. Dette er sett i tidligere fraksjoner som har vist å være flavon-glykosider (fraksjon E1.6.4.3.8.7 og fraksjon E4-5.2.5.4).

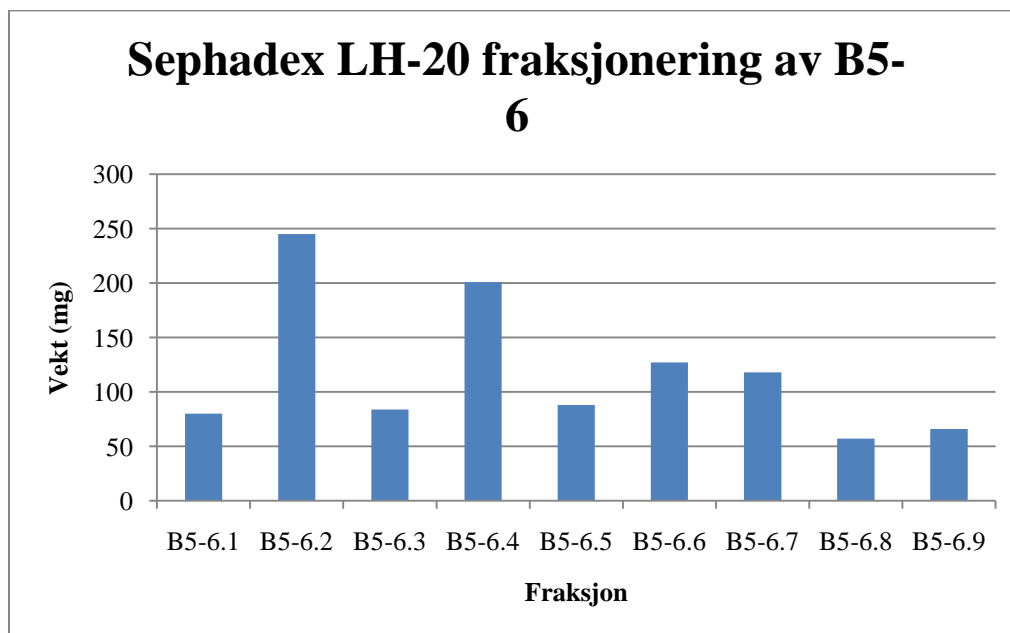
## Videre arbeid

Spektra til fraksjon B5 og B6 er mest interessante og veldig like. Disse blir derfor slått sammen for videre separasjon.

### 6.1.27 Videre separasjon av fraksjon B5-6

#### Sephadex LH-20 kolonnekromatografi

Fraksjon B5-6, 1030 mg, ble separert og fraksjonert på en Sephadex LH-20 kolonne, se kap 5.3.26. Det ble tilsammen samlet 48 fraksjoner som på bakgrunn av analytisk TLC etterfulgt av ceric-spraying, ble slått sammen til fraksjonene B5-6.1 til B5-6.9. Figur 6-17 viser vekt av fraksjonene.



Figur 6-17: Vekt av fraksjoner fra separasjon av B5-6 på Sephadex LH-20 kolonne.

## **NMR-spektroskopi**

$^1\text{H}$ -NMR-spektra til fraksjon B5-6.1 til B5-6.5 viser som for BuOH-fraksjonene mye fett og karbohydrater. Fraksjon B5-6.4 er mest interessant da den viser fire høye topper i aromat- og olefinområdet som kan komme fra protoner på et flavon-glykosid.

$^1\text{H}$ -NMR-spektra til fraksjon B5-6.6 til B5-6.9 er uinteressante da de hovedsakelig viser ftalat.

På grunn av manglende tid ble det umulig å videreføre dette arbeidet innen rammen av denne mastergradsoppgaven.

## 7. Etnofarmakologiske studier

### 7.1 Etnofarmakologi

Etnofarmakologi omfatter tverrfaglige vitenskapelige studier av biologisk aktive stoffer som tradisjonelt har vært benyttet eller kjent av mennesker. Etnofarmakologisk forskning består av mange ulike prosesser som observasjon, identifikasjon, beskrivelse og eksperimentell undersøkelse av ingredienser i innfødtes legemidler og effekten av disse (Heinrich, 2003). Dette krever et tverrfaglig forskningsteam bestående av farmakognoster, leger, botanikere, kjemikere og en farmakologisk, mikrobiologisk eller biokjemisk enhet avhengig av type bioassay (Pieters og Vlietinck, 2005). Viktige mål innen etnofarmakologi er dokumentasjon av innfødtes medisinske kunnskap, vitenskapelige studier av deres medisiner for på lengre sikt å bidra til et bedre helsetilbud for lokalsamfunnet i studien, og søk etter farmakologisk unike prinsipper fra eksisterende legemidler brukt av innfødte (Heinrich, 2003). Rundt halvparten av alle legemidlene som finnes på markedet i dag kommer fra naturlige produkter og deres semisyntetiske derivater (Iwu, 2002). Mange av disse ble opprinnelig oppdaget på bakgrunn av tradisjonell medisinsk bruk av planter. Noen av disse er opiater, kinin, vinkristin og digitalisglykosider (Cox og Balick, 1994).

### 7.2 Mali

Mali er et stort land i Vest-Afrika som grenser til Algerie, Niger, Burkina Faso, Guinea, Senegal, Mauritania og Elfenbenskysten (figur 7-1). Landet kan deles inn i 3 hovedområder: Den nordlige delen av Mali er dekket av Sahara-ørkenen, så terrenget er stort sett flatt med lite planteliv. Midtdelen er en overgang mellom ørken og savanne, mens det i sør er fuktig savanneklima. Størstedelen av befolkningen bor i sør, der landets to viktigste elver, Niger og Senegal befinner seg. Over 70 prosent av befolkningen driver med jordbruk, og de viktigste eksportvarene er bomull, kjøtt og gull. Landets økonomi påvirkes derfor sterkt av internasjonale prissvingninger og klimatiske endringer (Wikipedia, 2011). Flere perioder med alvorlig tørke har blant annet bidratt til å redusere husdyrbestanden og utbyttet fra landbruk og fiske. Mali var fransk koloni fra slutten av 1800-tallet under navnet Fransk Sudan, men ble selvstendig i 1960 (Store Norske leksikon, 2011).



Mali er ett av verdens fattigste land, og i juli 2011 er befolkningen anslått å være på ca. 14 millioner. Forventet levealder er kun 52,6 år og 64 prosent av befolkningen lever under fattigdomsgrensen. Landet har høy spedbarnsdødelighet, og 47,3 % av innbyggerne er under 15 år. Fattigdom, mangel på tilgang til rent drikkevann, feilernæring og dårlig hygiene gjør at risikoen for å bli smittet av infeksjose sykdommer er svært høy. Vanligst er bakteriell og protozoell diaré, hepatitt A, tyfoidfeber, malaria, schistosomiasis og meningokokkmeningitt (CIA, 2011).



Figur 7-1: kart over Afrika og Mali.

## 7.3 Tradisjonell medisin

Mali har et helsesystem som består av en blanding av konvensjonell og tradisjonell medisin. 70 prosent av befolkningen bor på landsbygda med svært begrenset tilgang på moderne legesenter, og derfor bruker 80 prosent av befolkningen tradisjonell medisin. I tillegg er prisen på konvensjonelle legemidler svært høy sammenliknet med inntektsnivå, og dette har ført til en økning i bruk av tradisjonell medisin (Diallo et al., 2002).

Den tradisjonelle medisinen omfatter bruk av droger (urter, planter, dyr og mineraler), doseringer og praksiser basert på sosiokulturelle normer, religiøs tro, og opplevde erfaringer og observasjoner gjort av en spesifikk gruppe, hovedsakelig tradisjonelle healere og urtekyndige. Denne kunnskapen blir overført fra generasjon til generasjon i muntlig eller skriftlig form (Inngjerdingen et al., 2004). De fleste planter som brukes har bare i liten grad blitt undersøkt med henblikk på deres kjemiske sammensetning eller farmakologiske aktivitet.

Det som i dag heter Département de la Médecine Traditionnelle (DMT), har siden 1973 arbeidet med å bedre den generelle folkehelsen ved å fokusere på lokale healere, og sørge for at tradisjonell medisin komplementerer den konvensjonelle medisinen. Blant annet forskes det på toksisitet av planter i bruk, i tillegg til at det utvikles såkalte improved traditional medicines (ITM) som er forbedrede formuleringer av tradisjonelle medisiner. DMT har til nå utviklet 12 ITM som har blitt standardisert i henhold til tradisjonelle administrasjonsregimer. Disse har blitt testet for mangel på toksisitet, og holdbarhetsdato for produktene har blitt bestemt. Syv av disse er essensielle legemidler i Mali og selges i apotek over hele landet. DMT er en del av Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP), og har siden 1990-tallet samarbeidet med verdens helseorganisasjon (WHO) og universitetene i Oslo, Toulouse, Marseille, Lausanne og Messina (Diallo og Paulsen, 2000).

## 7.4 Feltarbeid i Mali

Det ble utført feltarbeid i Mali over en 4-ukers periode i januar og februar 2011. I alt ble 38 healere intervjuet: 1 healer fra Bamako, 7 healere fra Siby-området og 30 healere fra Dioila-området. Det ble hovedsakelig samlet inn informasjon om *Biophytum petersianum* og *Ximenia americana*. Noe informasjon ble samlet inn om *Vernonia kotschyana*, men siden denne planten ikke vokste i de områdene intervjuene fant sted, var det få som kjente til denne. Healerne ble spurt om indikasjon for bruk, benyttet plantedel, tilberedelse, administrasjon og dosering. Bare resultatene for *B. petersianum* vil bli presentert her.

Healerne ble intervjuet individuelt. Hvert intervju varte 15-20 minutter, og ble gjennomført på det lokale språket, hovedsakelig bambara. Deretter ble det oversatt til engelsk av tolk og intervjuer Drissa Diallo. I forkant av intervjuene ble healerne informert om hvorfor intervjuene ble gjennomført, og hva dataene ble brukt til. Det var opp til hver enkelt healer å bestemme om de ville delta eller ikke. Etter hvert intervju, mottok hver healer 2000 CFA (ca. 25 Kr) og en pose med cola-nøtter. Dette ble gjort for å vise healerne at vi respekterer tradisjoner.



Figur 7-2: Tørket *B. petersianum*.

### 7.4.1 Feltarbeid i Bamako

I Bamako, hovedstaden i Mali, ble en healer intervjuet 2. februar 2011. Med på reisen var to personer fra DMT: Drissa Diallo og botanikeren N’Golo Balo. Drissa Diallo var intervjuer og tolk, mens N’Golo Balo var med for å ta notater og sikre at det var samme plante vi snakket om. Et problem med *B. petersianum* er at den er vanskelig å få tak i, særlig utenfor regnsesongen. Derfor regnes to håndfull med plante som mye, og en håndfull er vanligvis nok. Lokalnavnet på *B. petersianum* er Djoulatougou eller Julatugu. Resultatet fra healerintervjuet er presentert i tabell 7-1.

Tabell 7-1: Oversikt over resultatet fra healerintervjuet i Bamako.

Healerens navn, alder og kjønn	By	Indikasjon	Tilberedning, administrasjon og dosering
Modibo Camara, 51 år, M	Bamako	Hemoroider	En håndfull av hele planten kokes i 1 l vann i 10 minutter. Når temperaturen på løsningen er ca. 37 °C, skal barnet sette seg i hele løsningen i 5-10 minutter. Dette gjøres 2 ganger daglig. I tillegg skal 1 håndfull plante pulveriseres. Pulveret påføres rektum 1 gang daglig.

### 7.4.2 Feltarbeid i Siby-området

I Siby-området ble 7 healere, 3 kvinner og 4 menn, fra tre ulike landsbyer intervjuet 9. februar 2011. Med på reisen var to personer fra DMT: Drissa Diallo og botanikeren N’Golo Balo. Drissa Diallo var intervjuer og tolk, mens N’Golo Balo var med for å ta notater og sikre at det var samme plante vi snakket om. *B. petersianum* er vanskelig å få tak i utenfor regnsesongen, og derfor bruker man det man har/finner av hele planten. Fem healere brukte *B. petersianum* mot nevrologisk malaria hos barn, en healer brukte det mot nevrologiske sykdommer generelt og angst, mens en healer brukte ikke *B. petersianum* i det hele tatt. Lokalnavnet på *B. petersianum* er Déni malola. Resultatene fra healerintervjuene er presentert i tabell 7-2.

Tabell 7-2: Oversikt over resultater fra healerintervjuer i Siby-området.

Healerens navn, alder og kjønn	Landsby	Indikasjon	Tilberedning, administrasjon og dosering
Farima Koné, 90 år, K	Djissoumala	Nevrologisk malaria	Tørr plante pulveriseres, tar 5 finger med pulver og blander med ½ l vann og påføres huden 1 gang daglig i 1-3 dager. Gå til lege hvis ikke bedring
Maimouna Coulibaly, 60 år, K	Djissoumala	Nevrologisk malaria	Fem finger med plante varmes til kokepunktet i ½-1 l vann. 1 håndfull drikkes, resten brukes til å vaske kroppen. Gjøres 2 ganger daglig i 2 dager
Naténé Camara, 80 år, K	Djissoumala	Nevrologisk malaria	Tørkes og lager dekokt. Drikkes og kroppen vaskes 1 gang daglig til kurert. Kan også pulverisere, ta 4 finger med pulver og blander med litt sheabutter i håndflaten → påføres hele kroppen 1 gang daglig til kurert. Må beskytte pulveret/planten mot støv.
Fadama Keita, 86 år, M	Djikono	Nevrologisk malaria	Dekokt → drikker og vasker kroppen eller pulver + sheabutter påføres kroppen eller 3 finger pulver i vann og ha i munnen til barnet. Hvis ikke effekt samme dag, må medisinen endres.
Sakaba Cambara, 82 år, M	Djissoumala	Nevrologiske sykdommer som tetanuskramper og ved angst	Dekokt av 1 håndfull av hele planten og 3 tekopper vann (1 tekopp = 3 teglass). Drikker og vasker kroppen. Hvis ikke bedring etter 1 dag må medisinen endres.
Fassé Camara, 72 år, M	Kakala		Bruker ikke <i>Biophytum</i>
Abou Traoré, 38 år, M	Djissoumala	Nevrologisk malaria	Akutt situasjon → ikke tid til å lage dekokt. 3 finger pulver av planten + olje i

			håndflaten blandes. Masserer barnet med denne blandingen 1 gang daglig til kurert.
--	--	--	--

### 7.4.3 Feltarbeid i Dioila-området

I Dioila-området ble 30 healere, 10 kvinner og 20 menn, fra 10 ulike landsbyer intervjuet 12., 13. og 14. februar 2011. Med på reisen var to personer fra DMT: Drissa Diallo og botanikeren N’Golo Balo. Drissa Diallo var intervjuer og tolk, mens N’Golo Balo var med for å ta notater og sikre at det var samme plante vi snakket om. *B. petersianum* er vanskelig å få tak i utenfor regnsesongen, og derfor bruker man den mengden man får tak i. Man bør under regnsesongen samle, tørke og pulverisere det man finner. Hele planten ble brukt hvis ikke annet er spesifisert. To healere ble intervjuet sammen fordi de ønsket det og brukte planten mot samme indikasjon på samme måte. To av healerne brukte ikke planten, mens en healer hadde informasjon om planten, men hadde ikke praktisert det ennå. Derfor ville han ikke fortelle oss det han visste fordi han mente han ikke hadde noe bevis på at det fungerte.

Healerne brukte *B. petersianum* mot tilsammen 19 ulike indikasjoner. De hyppigst nevnte indikasjonene var nevrologisk malaria (12), hemoroider (3) og tykktarmslidelser (2).

Lokalnavn på *B. petersianum* i Dioila-området er Djoutougouni eller Jutuguni. Healerne i dette området har møte med leger/helsesentre hver første søndag i måneden. Dette gjør de for å ha en god kommunikasjon med leger og på denne måten forbedre tradisjonell medisin i området. Resultatene fra healerintervjuene er presentert i tabell 7-3.

Tabell 7-3: Oversikt over resultater fra healerintervjuer i Dioila-området.

Healerens navn, alder og kjønn	Landsby	Indikasjon	Tilberedning, administrasjon og dosering
N’Golo Sidibe, 58 år, M	Dioila	Eksterne sår	Plante pulveriseres og blandes med frukten av <i>Cissus populnea</i> . Dette påføres såret 2 ganger daglig i starten, deretter 1 gang daglig ved bedring. Viktig at såret vaskes godt før påføring. Selv om medisinen er god, vil man ikke få effekt hvis ikke såret er vasket godt!

Djoba Togola, alder ikke angitt, K	Dioila	Nevrologisk malaria	Pulver blandes med olje og påføres kroppen morgen og kveld til bedring.
Fousseny Coulibaly, 42 år, M	Dioila	Tykkttarmslidelser	En håndfull pulver og 3-4 teglass vann kokes i 1,5 time. Løsningen filtreres og man drikker 1 teglass daglig i 2 dager. Hvis ikke bedring etter 2 dager gjentas prosedyren med ny løsning.
Kolifa Togola, 74 år, M	Dioila	Nevrologisk malaria  Konjunktivitt	Tre finger pulver blandes med en liten mengde vann. Drikkes 1 gang daglig til bedring.  Dekokt av hele planten brukes til øyevaske hver morgen
Assétou Doumbia, 55 år, K	Dioila	Nevrologisk malaria	Tre finger pulver blandes med litt vann. Barnet drikker dette. 1 gang er nok, men kan gjentas inntil 3 dager.
Biama Konaté, mer enn 60 år, M	Sirimanbougou	Nevrologisk malaria	Tre finger pulver blandes med vann og barnet vaskes med blandingen. Samme kvantitet brennes og strøs rundt barnet. Begge deler gjøres 1 gang daglig i inntil 3 dager.
Bakary Sangaré, 45 år, M	Dioila	Colonopathy	Tre finger pulver blandes med 1 teglass vann. Dette skal barnet drikke sakte 1 gang daglig inntil bedring.
Aliou Moriba Sidibe, 65 år, M	Wakoro Babilébougou		Bruker ikke <i>Biophytum</i>
Brama Konaté, 60 år, M	Sirimanbougou	Nevrologisk malaria	Tre finger pulver blandes med 1 teglass sitronjuice (maserasjon) i noen få minutter. Blanding

			filtreres og barnet drikker 1 teglass filtrat daglig i 3 dager.
Mariam Traoré, 66 år, K	N'Djana	Nevrologisk malaria	Tre finger pulver blandes i vann. Dette drikkes, påføres hodet og kroppen vaskes.
Korotini Sidibé, 58 år, K	Dioila	Interne sykdommer	To finger pulver blandes med 1 teglass varmt vann. Drikkes 1 gang daglig i 7 dager.
Nah Traoré, 64 år, K	Dioila	Mot magesår, diaré og malaria	Dekokt av nok plante drikkes og tar bad til kurert.
Moussa Sidibé, 65 år, M	Dioila	Nevrologisk malaria  Hemoroider	En ts pulver blandes med 30 g olje/sheabutter. Dette påføres kroppen til barnet hver morgen i 3 dager.  Pulver av bladene påføres rektum morgen og før sengetid i 4 dager i 1 uke.
Daouda Sidibé, mer enn 70 år, M	Dioila	Magekramper	Dekokt av nok plante. Drikker 1 ss løsning 3 ganger daglig i 1 uke.
Aminata Diarra, 51 år, K	Dioila	Nevrologisk malaria  Leversykdom	Dekokt av planten. Drikker 1 teglass daglig, men skal være kurert etter 1 gang.  Dekokt av planten. Ett teglass drikkes morgen og kveld i 1 måned.
M'Penécoura Mariko, 100 år, K	Dioila	Nevrologisk malaria	Planten blandes med kaldt vann (på grunn av akutt situasjon → må gjøres raskt). Baby vaskes med løsningen 1 gang daglig til barnet er kurert.
Bah Togola, 66 år, M	N'Djana	Epilepsi	½ ts pulver i ½ teglass vann drikkes morgen og kveld. Vasker også



		Hemoroider	kroppen med løsningen.  Samme pulver blandes med vann og personen sitter i løsningen. Pulveret påføres også rektum. 3 finger pulver blandes med vann og drikkes 1 gang daglig i 3-4 dager.
Djénéba Mariko, 40 år, K	N’Gala		Bruker ikke <i>Biophytum</i>
Jacouba Fomba, 69 år, M	Tiendou	Astma	Tre finger pulver av bladene + salt svelges hver dag.
N’Golo Fomba, 78 år, M	Kamanbougou	Styrkedrikk	Pulveret blandes med varmt vann. Vasker baby med løsningen.
Mahamoudou Traoré, 41 år, M	Dioila		Bruker ikke <i>Biophytum</i>
Lassina Doumbia, 57 år, M	Dioila		Har informasjon om <i>Biophytum</i> , men har ikke prøvd det ut → har ikke bevis og vil ikke fortelle oss.
Mamoudou Mariko, 58 år, M	Dioila	Mot blødning som ikke stopper	Dekokt → drikker ½ l løsning 1 gang daglig til blødning stopper
Gaoussou Fofana, 47 år, M	Dioila	Hemoroider          Eksem	En ts pulver blandes med 30 g sheabutter. Dette påføres rektum morgen og kveld i 1 uke. Kan også drikke dekokt → ¼ l dekokt morgen etter frokost og ¼ l dekokt før sengetid i 1 uke.  En ts pulver blandes med 30 g sheabutter og påføres huden 2 ganger daglig i 15 dager.
Briama Samake, 81 år, M og Gaoussou	Banatou	Inkontinens	Tre finger pulver blandes med grøt. Dette drikkes 1 gang daglig mellom kl. 16.00 og 18.00.

Dembeli, 66 år, M		Sår på kjønnsorgan	Pulver av <i>Biophytum</i> og pulver av rota <i>Leptadenia hartata</i> blandes 1:1 og påføres såret 1 gang daglig.
Aissa Coulibaly, 35 år, K	Dioila	Nevrologisk malaria  Leukorea og blødning som ikke stopper	Tørket plante pulveriseres og blandes med kaliumhydroksid- løsning. Dette påføres huden til barnet 1 gang daglig til kurert.  Dekokt av 1 håndfull pulver per liter vann. Driker ½ l hver dag til kurert.
Youssouf Sangaré, 80 år, M	Sinflala	Nevrologisk malaria  Insektbitt/ skorpionstikk	Pulver blandes med vann. Vasker kroppen morgen og kveld til kurert.  Tre finger pulver blandes med litt vann. Påføres bittstedet mange ganger helt til smerten er borte.
Maténé Fomba, ca. 80 år, K	Fiana	Nevrologisk malaria	Fem finger pulver blandes med vann og vasker barnets kropp inkludert hode 1 gang daglig i 2 dager. Barnet må i tillegg drikke 1 håndfull løsning.
Seydou Fana, 76 år, M	Fiana	Infeksjon/ vaginitt  Lumbago (ryggsmerte)	Dekokt av 5 finger pulver i 3 teglass vann → filtrerer. 1 teglass filtrat drikkes 3 ganger daglig i 4 dager.  Blander pulver med sheabutter og påføres ryggen hver kveld til man er kurert eller føler seg bedre.

#### 7.4.4 Forklaringer til tabellene

- Antall finger: Mål for mengde plantemateriale. Indikerer antall fingre brukt som en ”klype”.
- Dekokt: Plantematerialet legges i en mengde kaldt vann og varmes til oppkok i en gitt tid.
- Håndfull: Hånden fylles.
- M: Mann K: Kvinne
- Maserasjon: Plantemateriale blandes med kaldt vann.
- Sheabutter: Naturfett fra frukten til Shea-treet, *Butyrospermum parkii* (syn. *Vitellaria paradoxa*).
- ss: spiseskje
- Teglass: En bestemt størrelse på et glass, rommer ca. 75 ml.
- ts: teskje

#### 7.4.5 Oppsummering av resultater fra healerintervjuer

Av de 38 healerne som ble intervjuet i Bamako, Siby- og Dioila-området var det totalt 34 som brukte *B. petersianum* i sin praksis. Tilsammen ble det oppgitt 20 indikasjoner, noe som viser at dette er en plante som brukes ved mange indikasjoner, og mange av indikasjonene er kun nevnt av en healer. Hele 17 av 34 healere brukte planten mot nevrologisk malaria. Noen av healerne brukte planten mot nevrologiske sykdommer, epilepsi og magekramper, og det er uvisst hvor spesifikke de har vært da disse indikasjonene er svært like. Noen healere forklarer indikasjonen ut i fra symptomene, mens andre vet spesifikt hva slags sykdom det er. Alle disse sykdommene, inkludert nevrologisk malaria, har krampetilstander i sykdomsbildet. Videre var det 4 healere som brukte planten mot hemoroider og 2 healere som brukte planten mot tykktarmslidelser. Noen healere brukte planten til flere svært ulike indikasjoner, for eksempel en healer brukte planten både ved vaginitt og ryggsmerten.

Dekokt av hele planten var den hyppigst oppgitte tilberedningsformen. Det skulle enten drikkes eller pasienten skulle vaskes med dekoktet. Pulverisert plante eventuelt blandet med olje ellers sheabutter ble ofte brukt til påsmøring på aktuell kroppsdel eller på hele kroppen.

## 8. Konklusjon

Fra etylacetat-ekstraktet av planten *B. petersianum* ble et renstoff som tidligere ikke er beskrevet i naturen isolert og strukturoppklart. Dette stoffet har strukturen apigenin 6-(2-propensyre). Det ble også isolert et flavonglykosid, cassiaoccidentalin A, som kun har blitt rapportert en gang tidligere i planten *Cassia occidentalis* (Leguminosae). I tillegg ble 3,4-dihydroksybenzosyre isolert og identifisert. Cassiaoccidentalin A og 3,4-dihydroksybenzosyre har ikke blitt tidligere blitt rapportert i *B. petersianum*.

Metanolrækstraktet og etylacetat-fasen viste seg å være gode hemmere av XO, men dårlige scavengere av DPPH og 15-LO. Butanol- og vannfasen var dårlige XO-hemmere og inaktive som 15-LO-hemmere og DPPH-scavengere. 3,4-Dihydroksybenzosyre var inaktiv som XO-hemmer, hadde lav 15-LO-hemmende effekt og moderat DPPH-scavengeraktivitet. Cassiaoccidentalin A hadde god 15-LO hemmende aktivitet, moderat XO-hemmende aktivitet, men var en dårlig DPPH-scavenger. Det nye stoffet, apigenin 6-(2-propensyre) ble ikke isolert i tilstrekkelige mengder til å utføre bioaktivitetsstudier.

Etnofarmakologiske studier utført i Mali viste at 34 av 38 healere intervjuet i Bamako, Siby- og Dioila-området brukte *B. petersianum* i sin praksis. Av 20 indikasjoner på bruk var nevrologisk malaria, hemoroider og tykktarmslidelser hyppigst nevnt. Hele 17 av 34 healere brukte planten mot nevrologisk malaria. Dette er også sett i tidligere arbeid gjort på planten. Dekokt av hele planten var den hyppigst oppgitte tilberedningsformen, og blandingen skulle i de fleste tilfeller drikkes, appliseres på de aktuelle behandlingsområdene eller pasienten skulle vaskes med dekoktet.

*Cassia occidentalis* finnes i en ”improved traditional medicine” i Mali som brukes mot malaria. Dette kan være en mulig forklaring på hvorfor så mange healere bruker *B. petersianum* mot malaria.

### 8.1 Forslag til videre arbeid

Det er flere interessante fraksjoner fra etylacetat-fasen som bør separeres videre for å finne andre stoffer i planten med biologisk aktivitet, som kan forklare plantens tradisjonelle medisinske bruk.

Det kan også være interessant å fortsette med BuOH-fasen og fraksjonere fraksjonene ytterligere da BuOH-fasen også viser noe XO-hemming. De få fraksjoneringstrinnene som er gjort tyder også på flavonglykosider, og det hadde vært interessant å få isolert og identifisert disse.

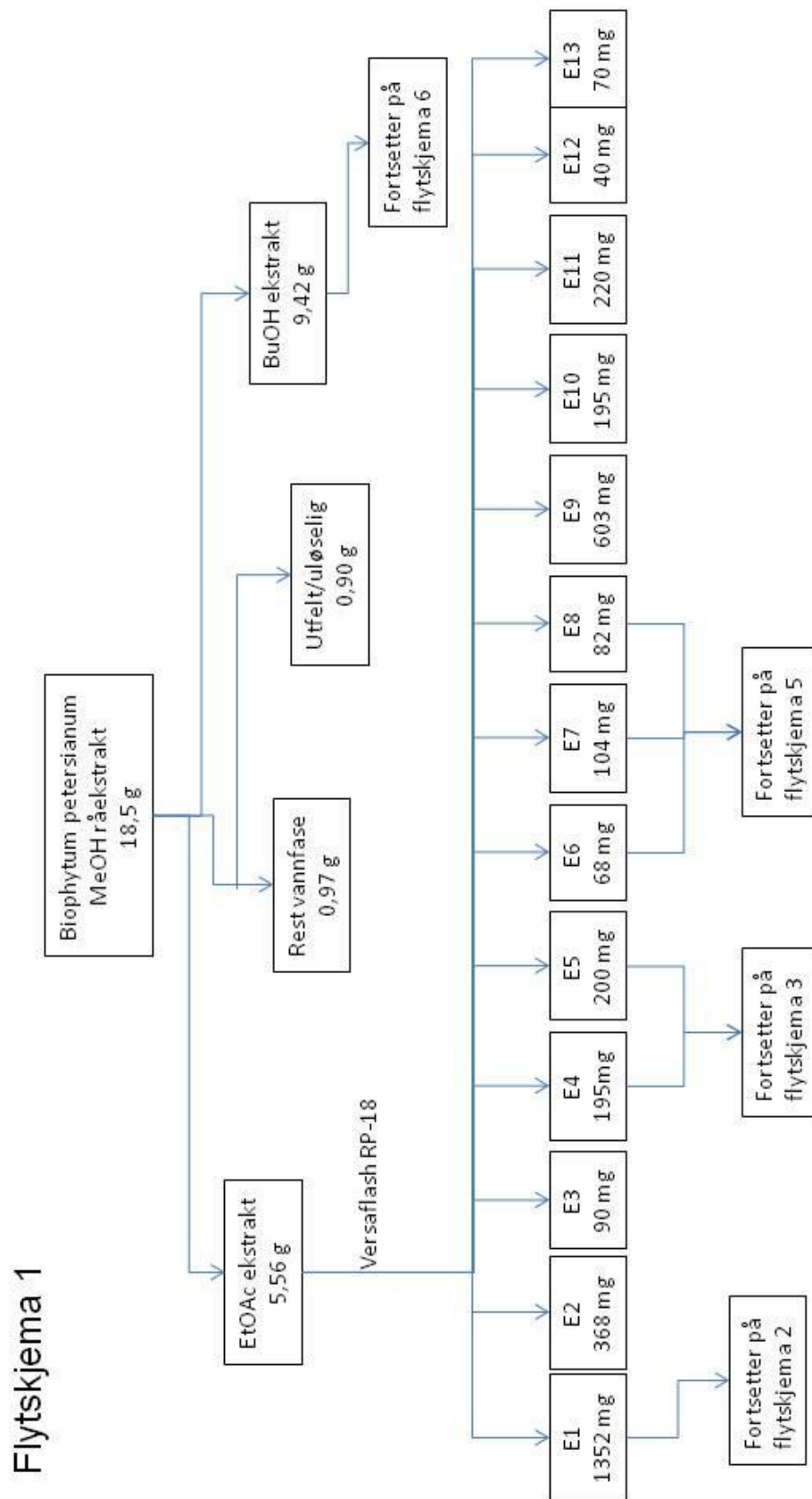
Det ble ikke utført bioaktivitetstester på det nye stoffet, apigenin 6-(2-propensyre), da det var for lite stoff. Det vil være aktuelt å gjennomføre dette. Komplet sett med NMR-data ( $^{13}\text{C}$ -NMR) og MS data vil gi bedre bevis for riktig identifikasjon.

Studier av eventuell antimalariaeffekt av cassiaoccidentalin A vil være av interesse.

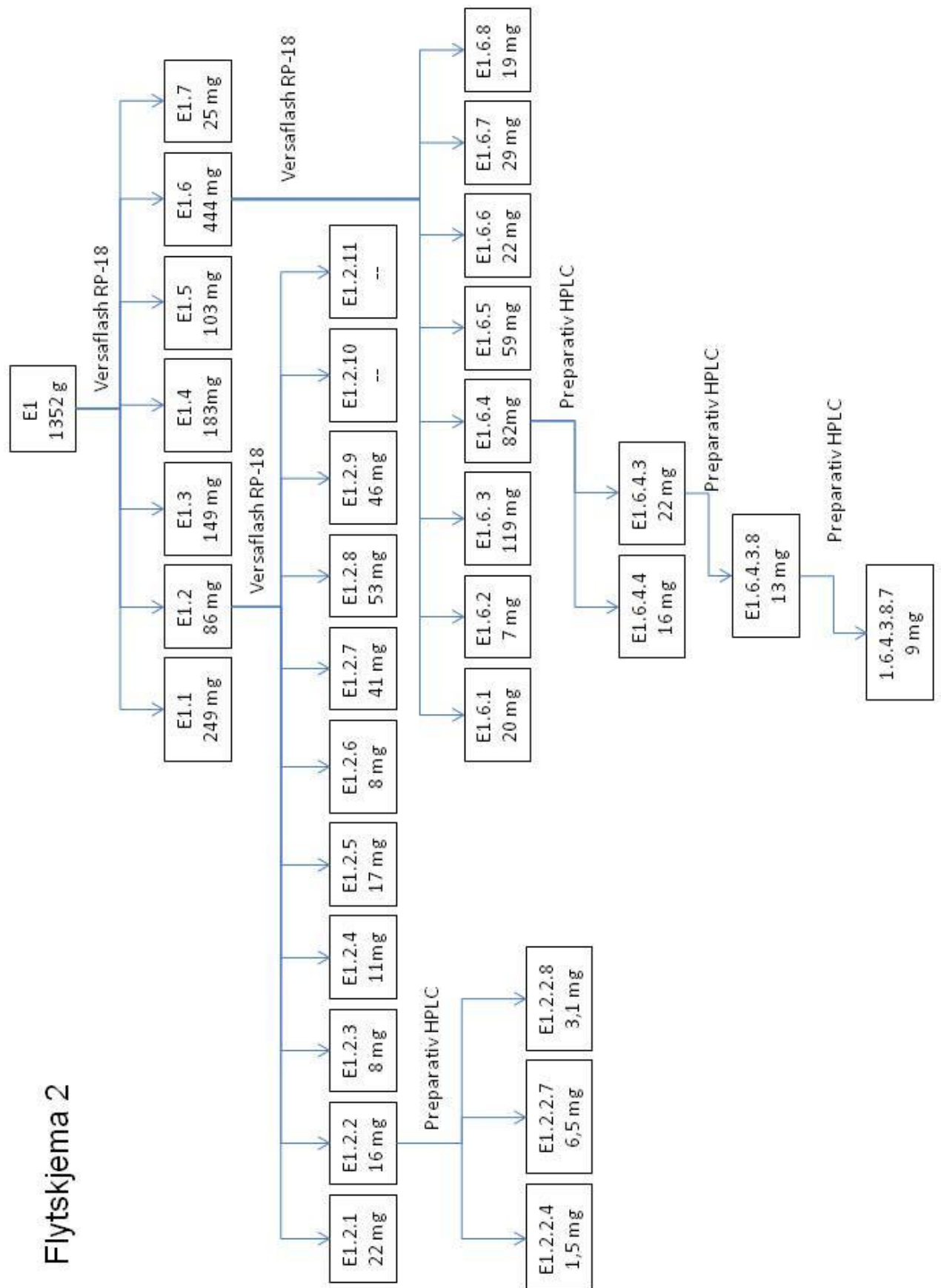
Hovedproblemet med de interessante fraksjonene var at det til slutt var for lite stoff til at fraksjonen kunne opprenses videre, og fraksjonen var fortsatt for uren til å kunne gi gode NMR-spektra som kunne brukes til å identifisere og strukturoppklare stoffet. En god ide er å begynne med en større mengde enn det som har blitt gjort i denne studien.

## 9. Vedlegg

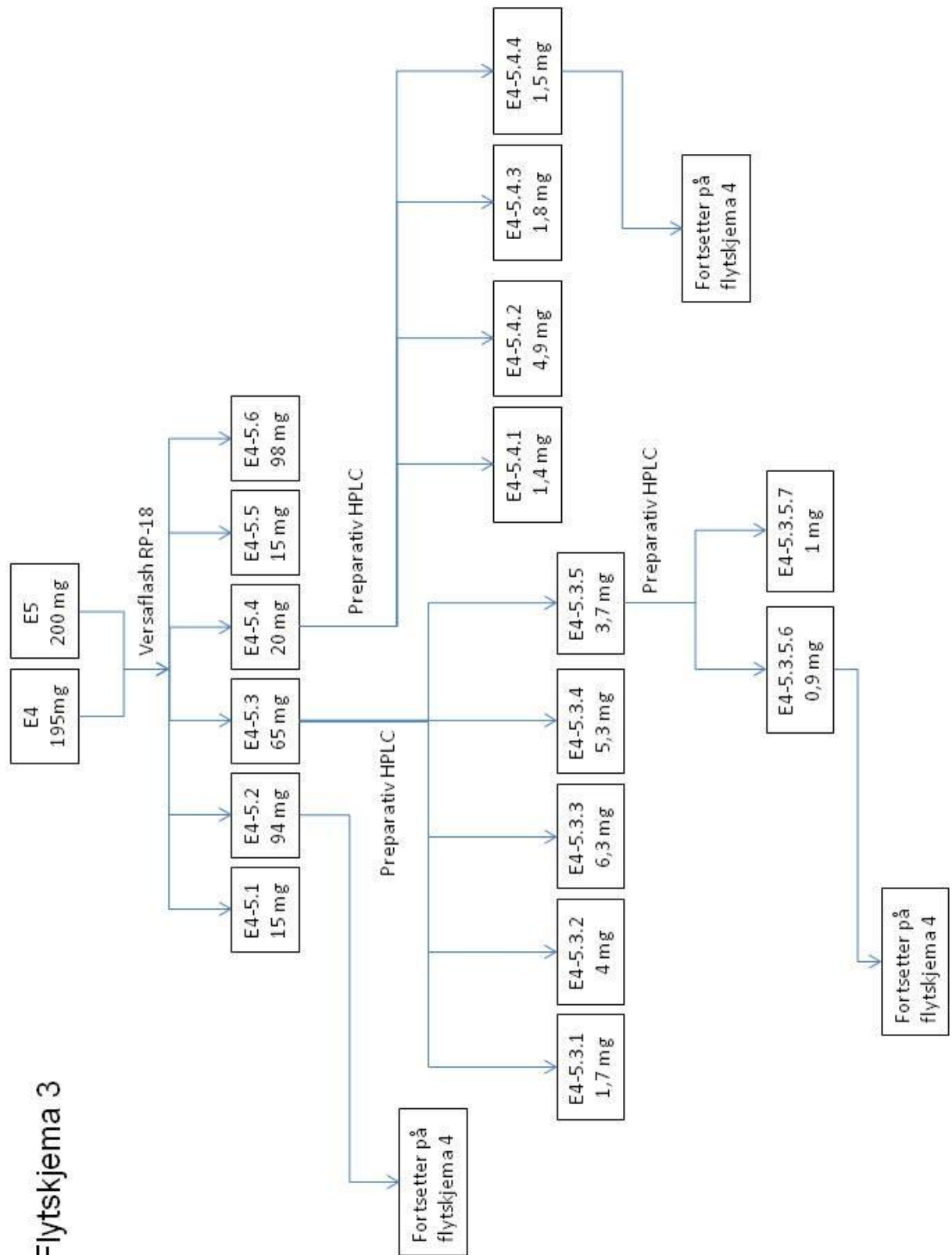
### 9.1 Flytskjema



## Flytskjema 2

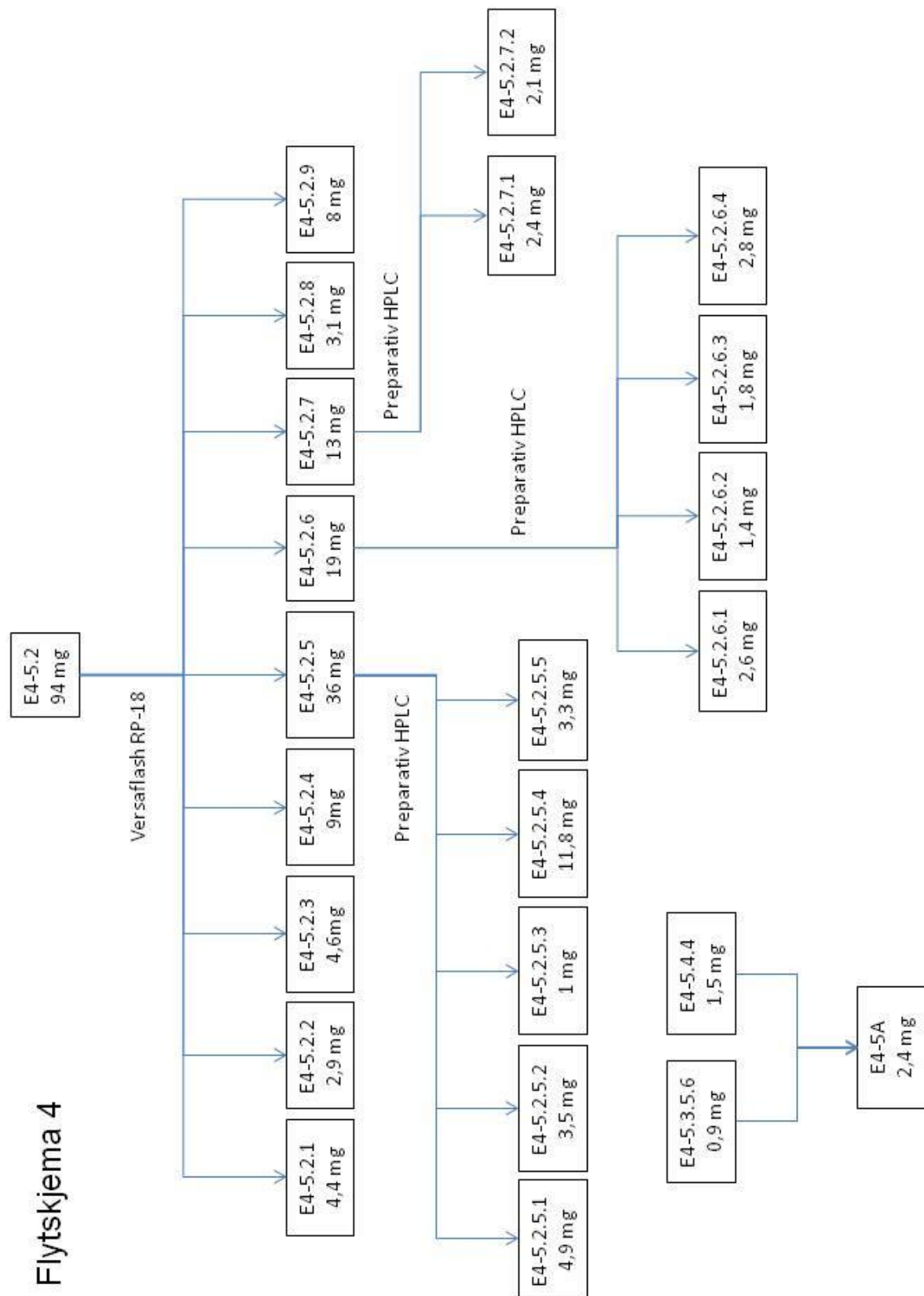


### Flytskjema 3

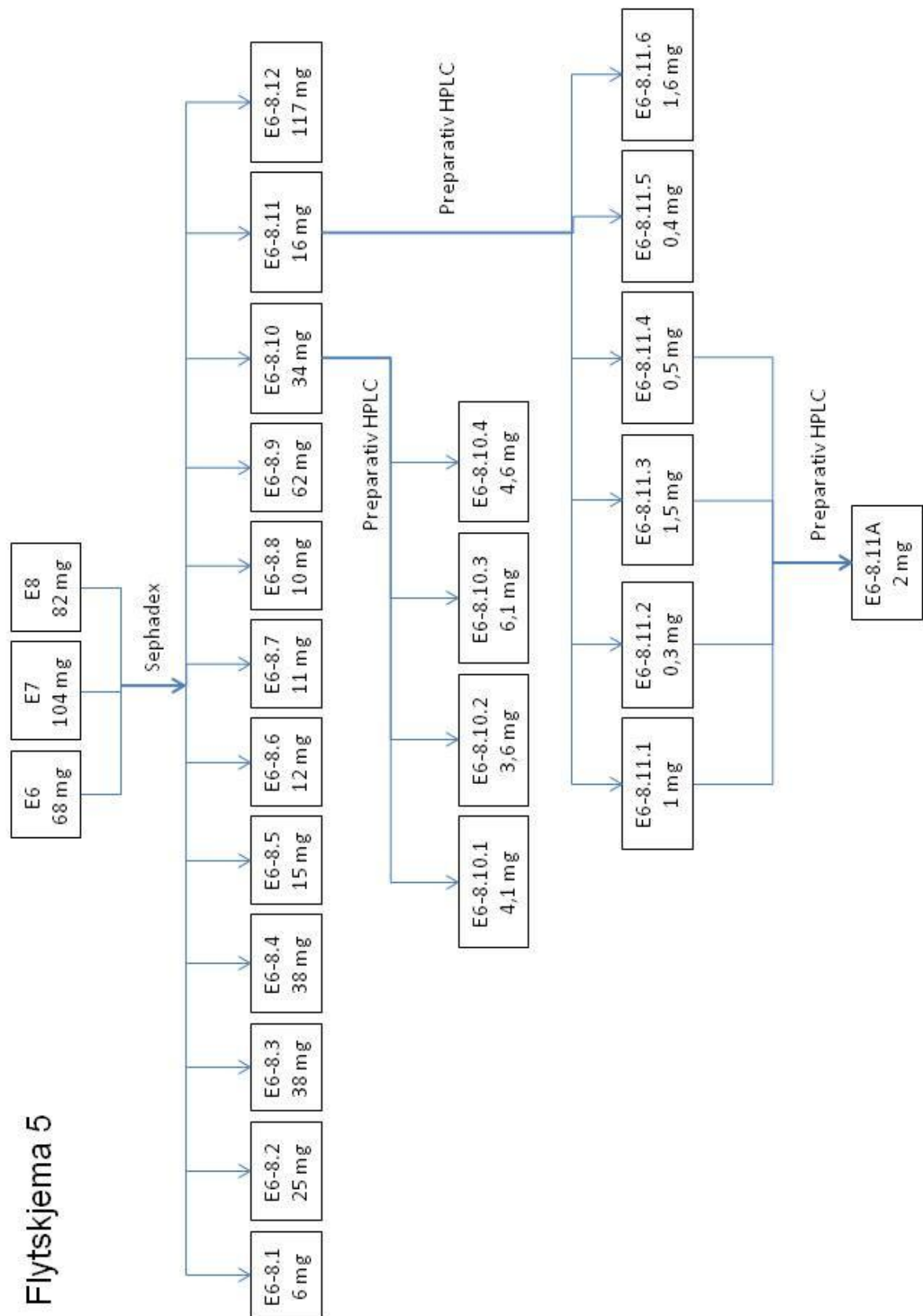




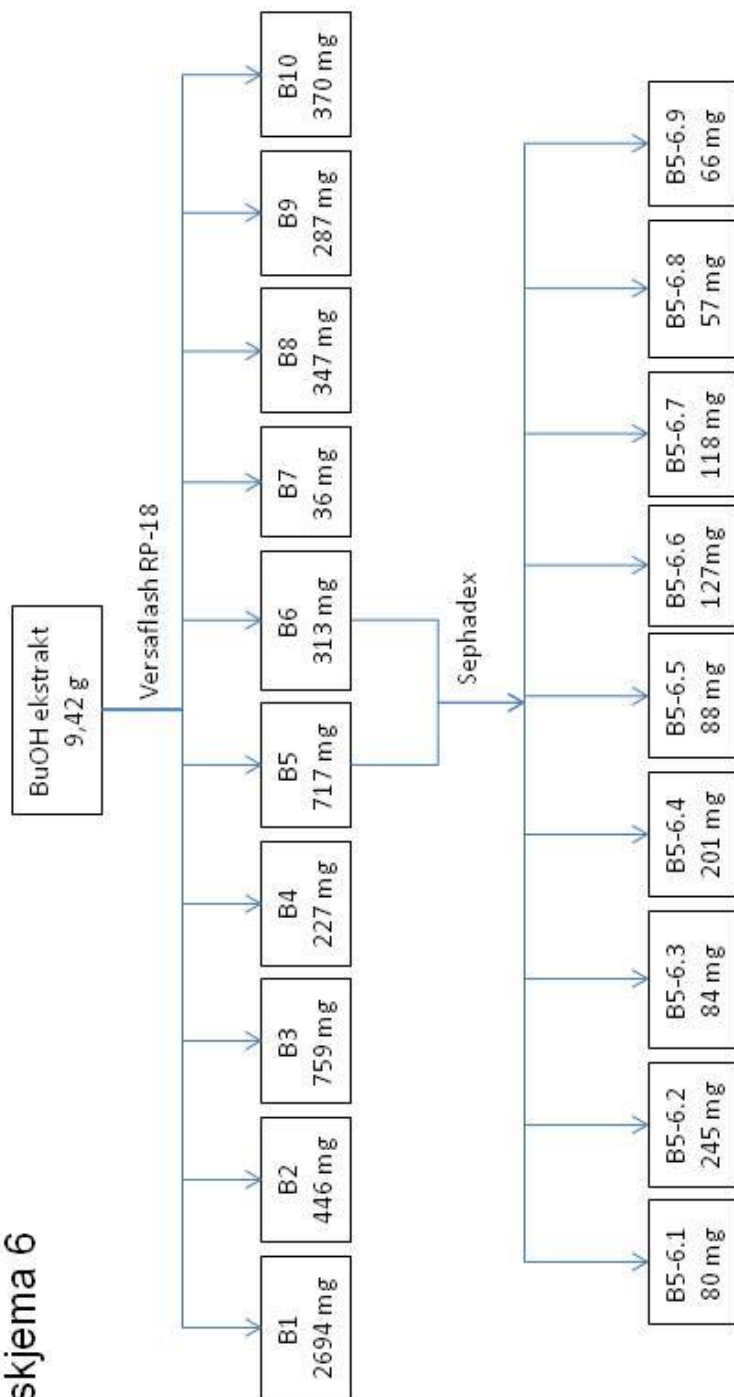
## Flytskjema 4



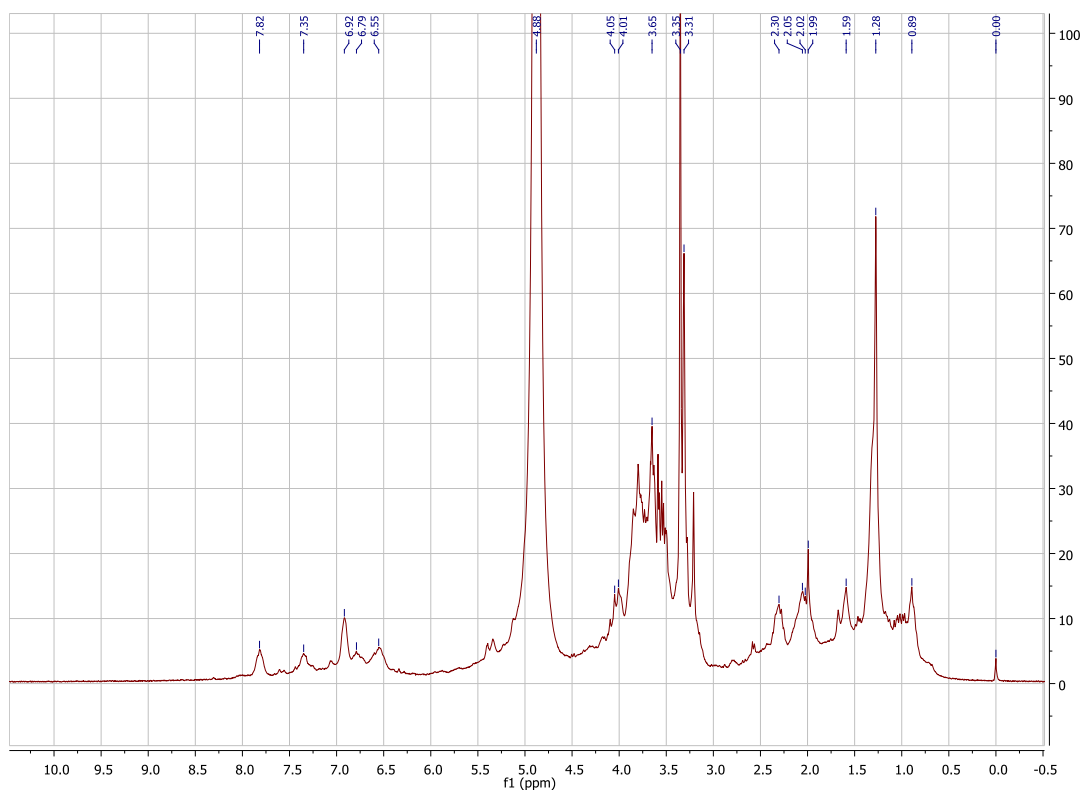
## Flytskjema 5



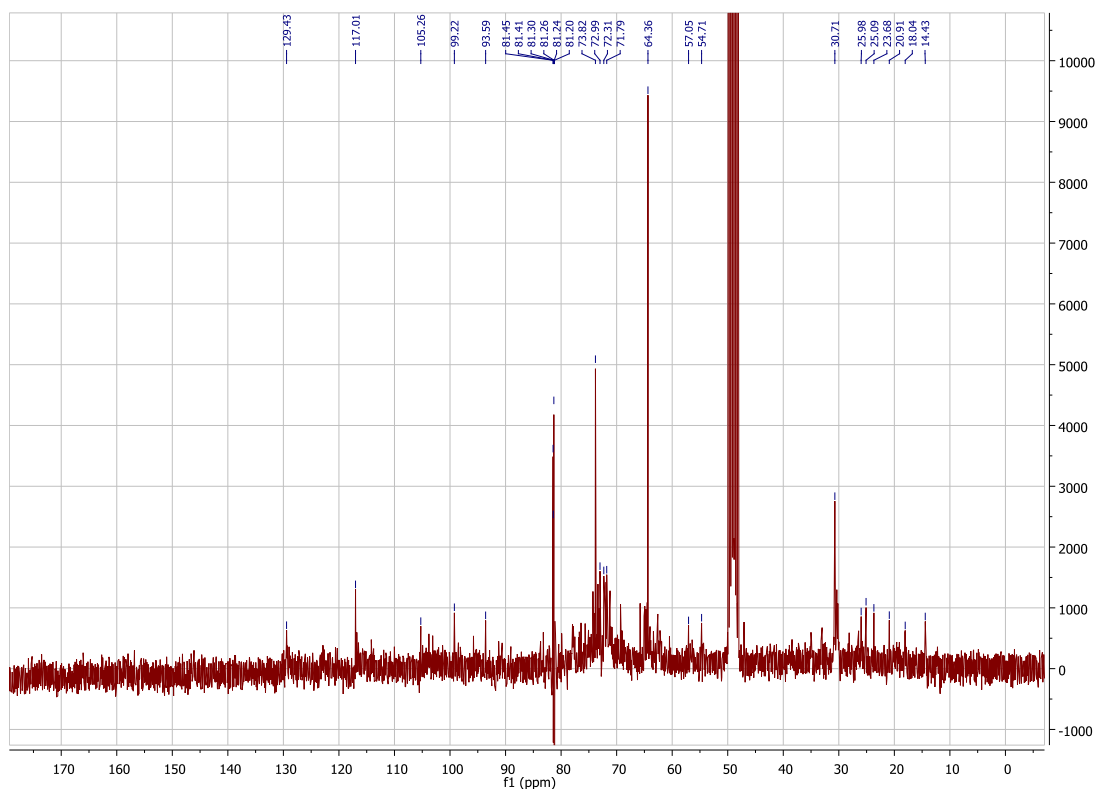
## Flytskjema 6



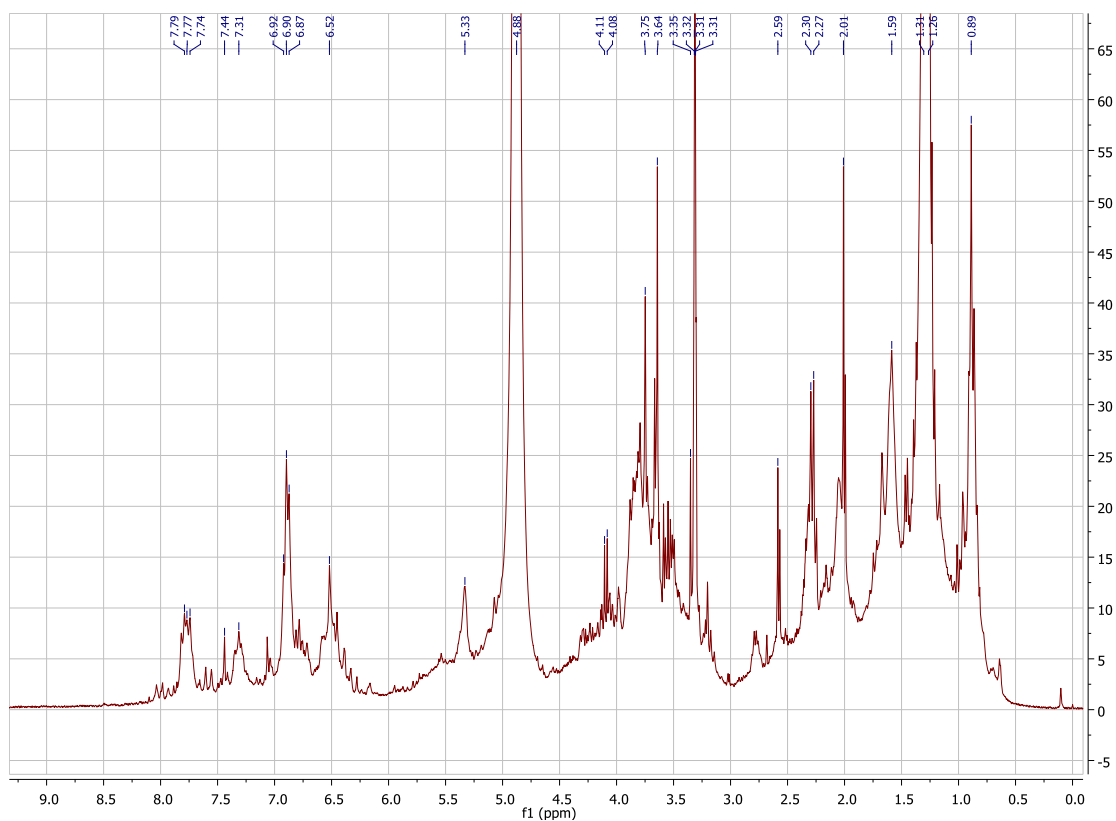
## 9.2 NMR-spektra



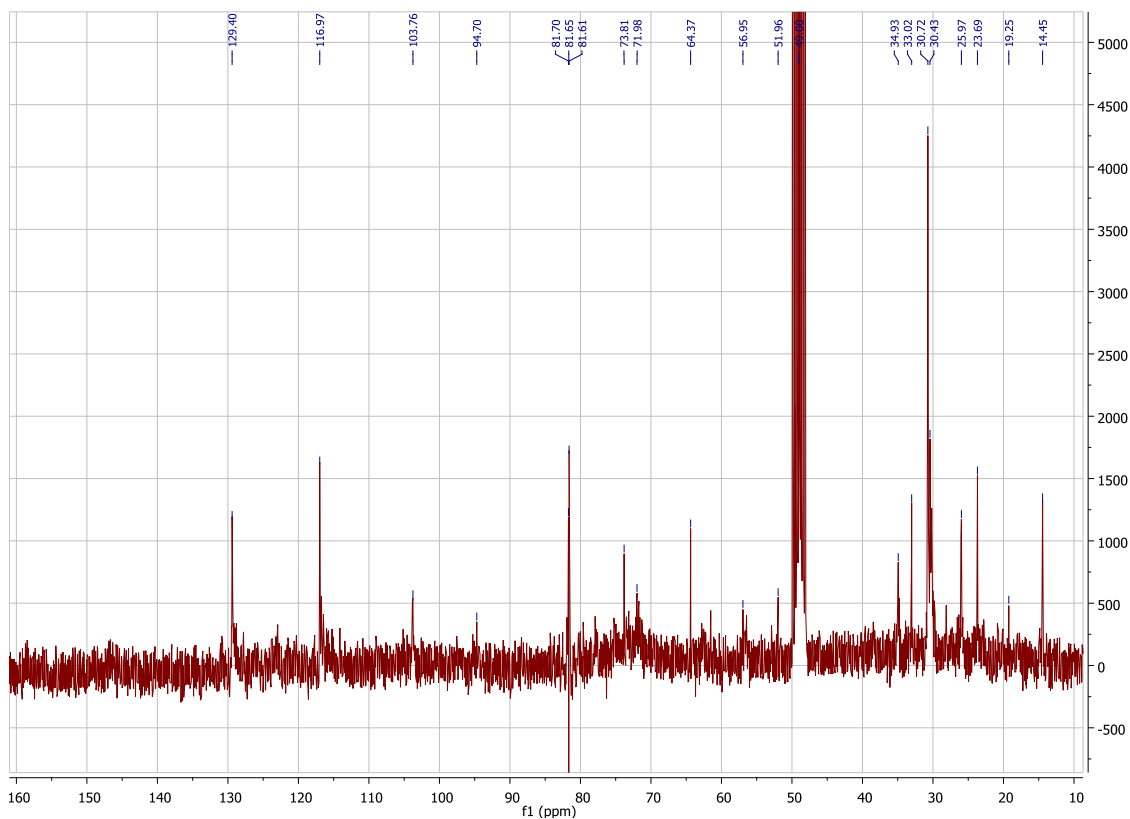
NMR-spektrum 1: <sup>1</sup>H-NMR-spektrum av metanolrækstrakt (CD<sub>3</sub>OD som løsningsmiddel).



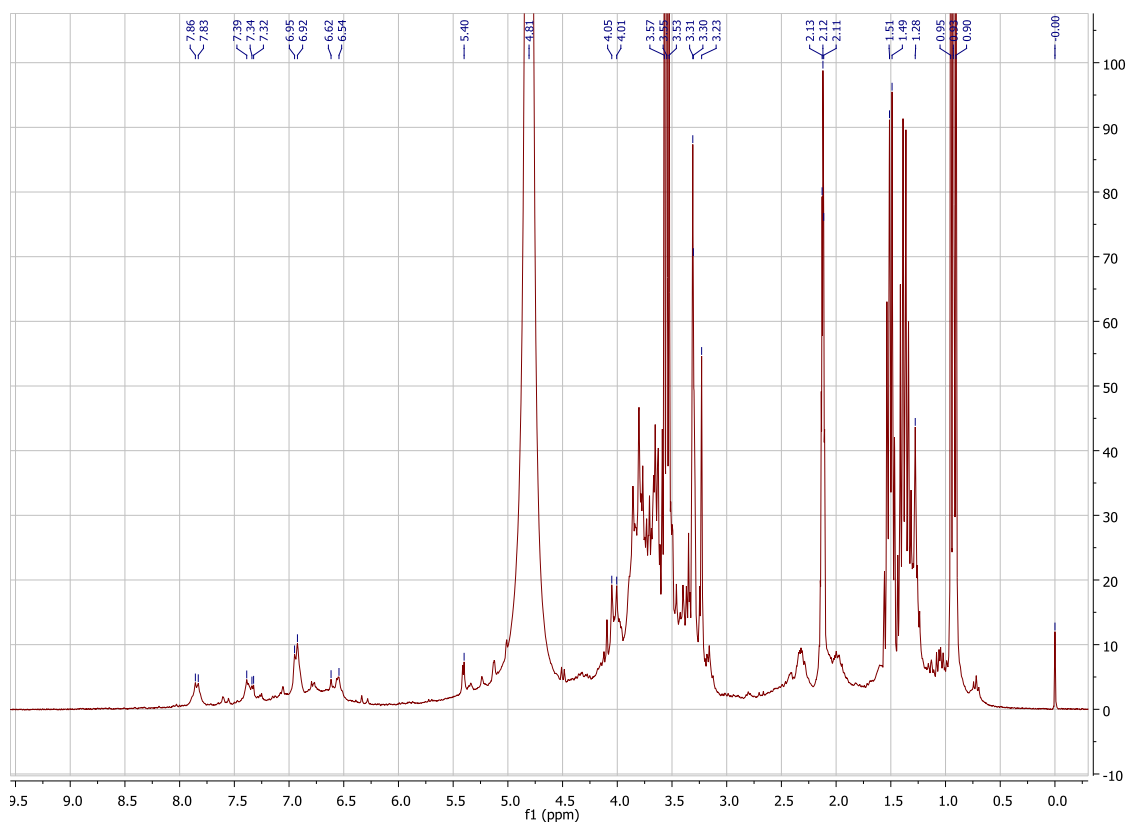
NMR-spektrum 2: <sup>13</sup>C-NMR-spektrum av metanolrækstrakt (CD<sub>3</sub>OD som løsningsmiddel).



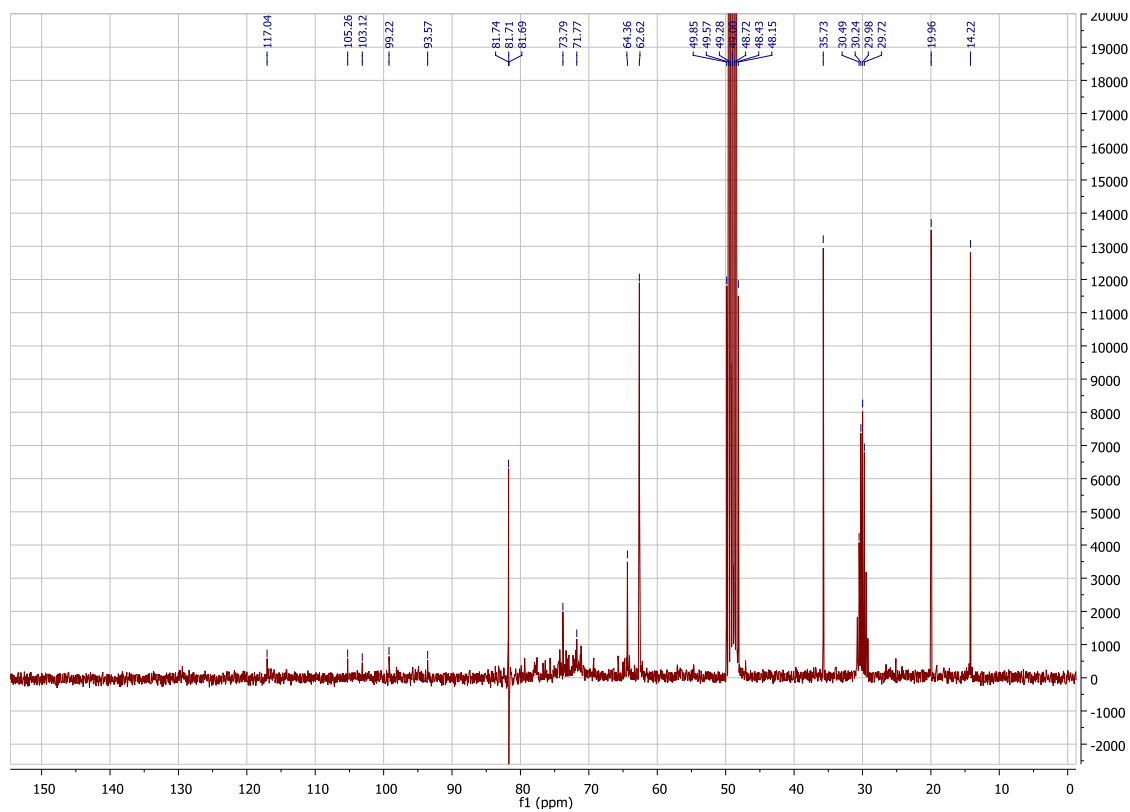
NMR-spektrum 3: <sup>1</sup>H-NMR-spektrum av EtOAc-ekstrakt (CD<sub>3</sub>OD som løsningsmiddel).



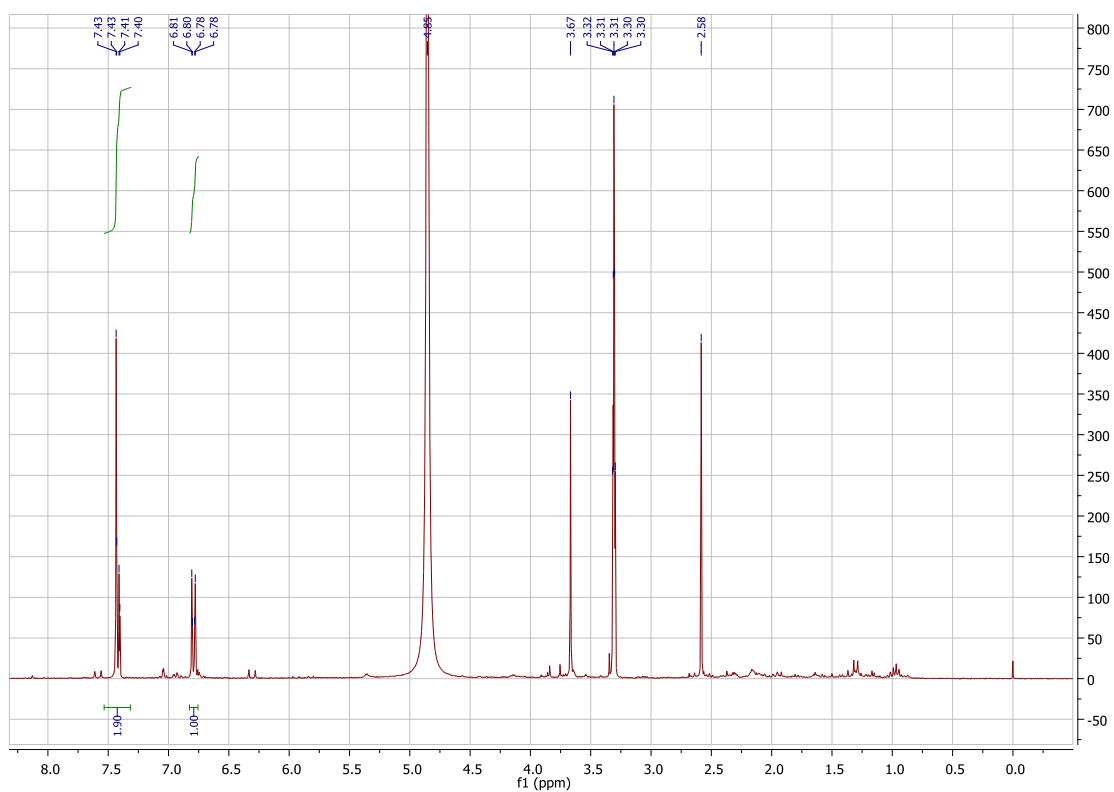
NMR-spektrum 4: <sup>13</sup>C-NMR-spektrum av EtOAc-ekstrakt (CD<sub>3</sub>OD som løsningsmiddel).



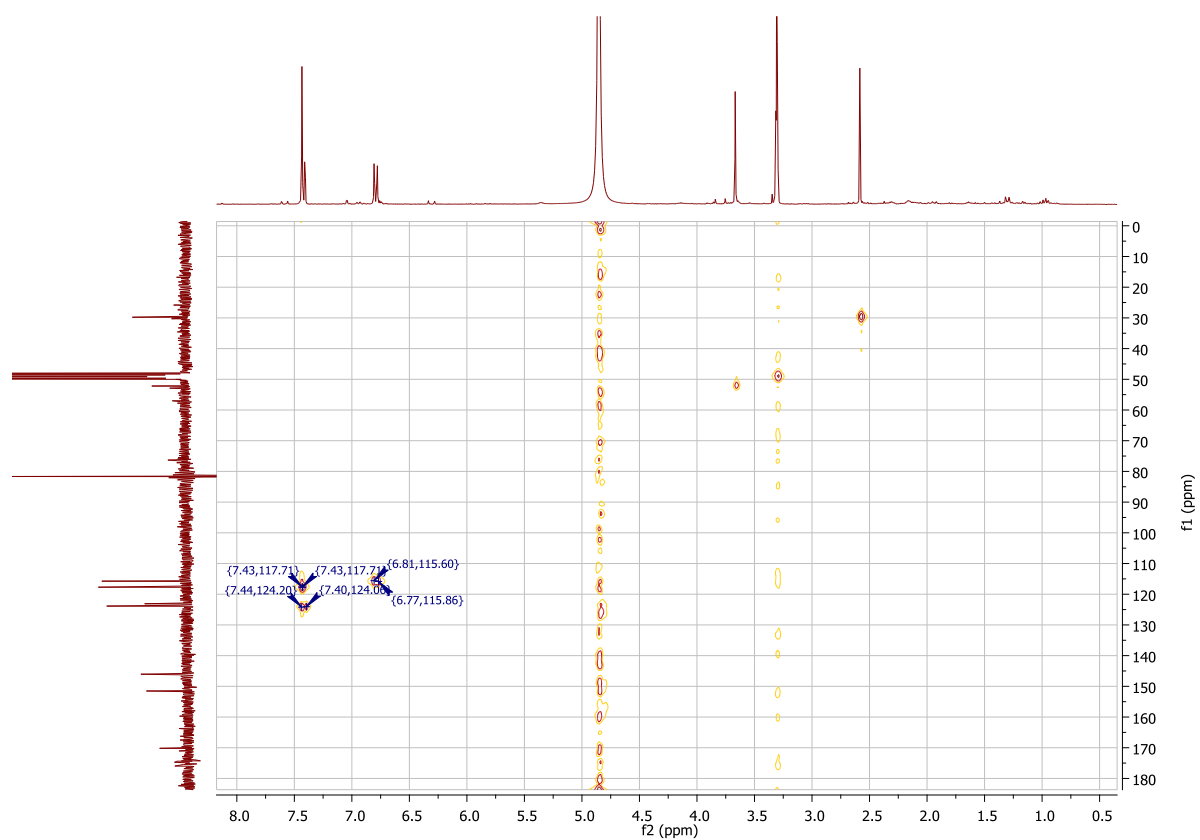
NMR-spektrum 5:  $^1\text{H}$ -NMR-spektrum av BuOH-ekstrakt ( $\text{CD}_3\text{OD}$  som løsningsmiddel).



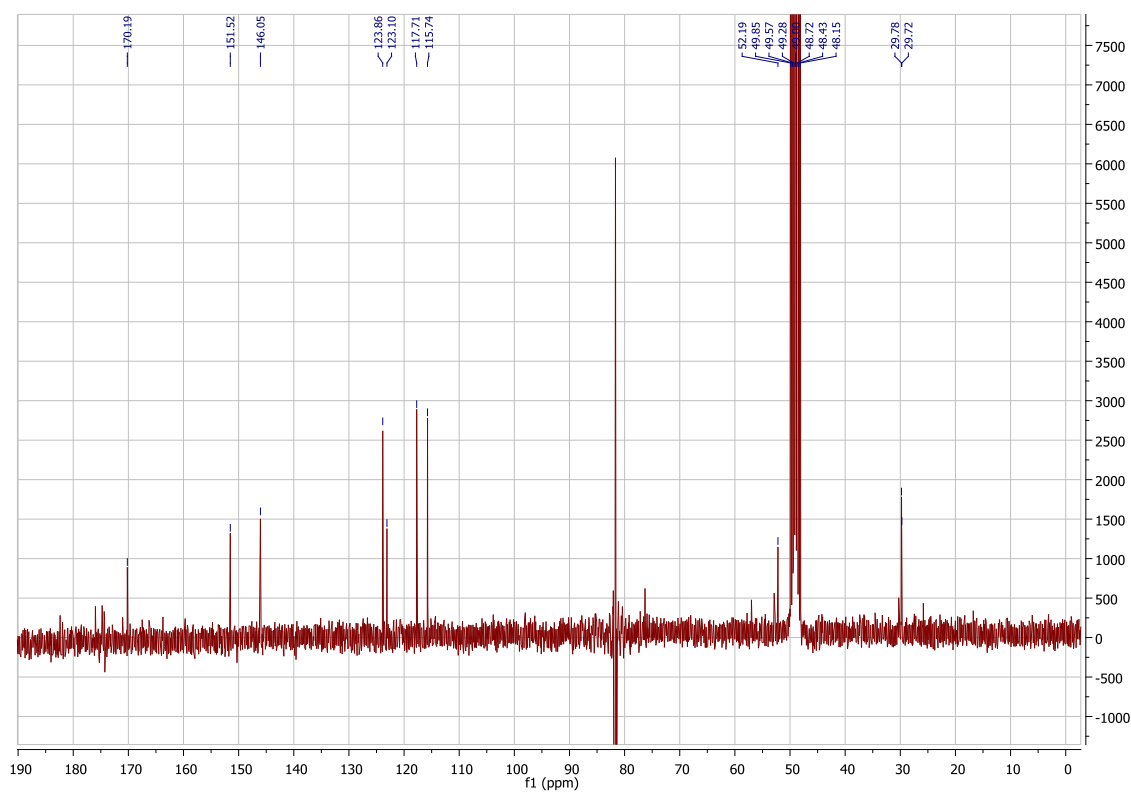
NMR-spektrum 6:  $^{13}\text{C}$ -NMR-spektrum av BuOH-ekstrakt ( $\text{CD}_3\text{OD}$  som løsningsmiddel).



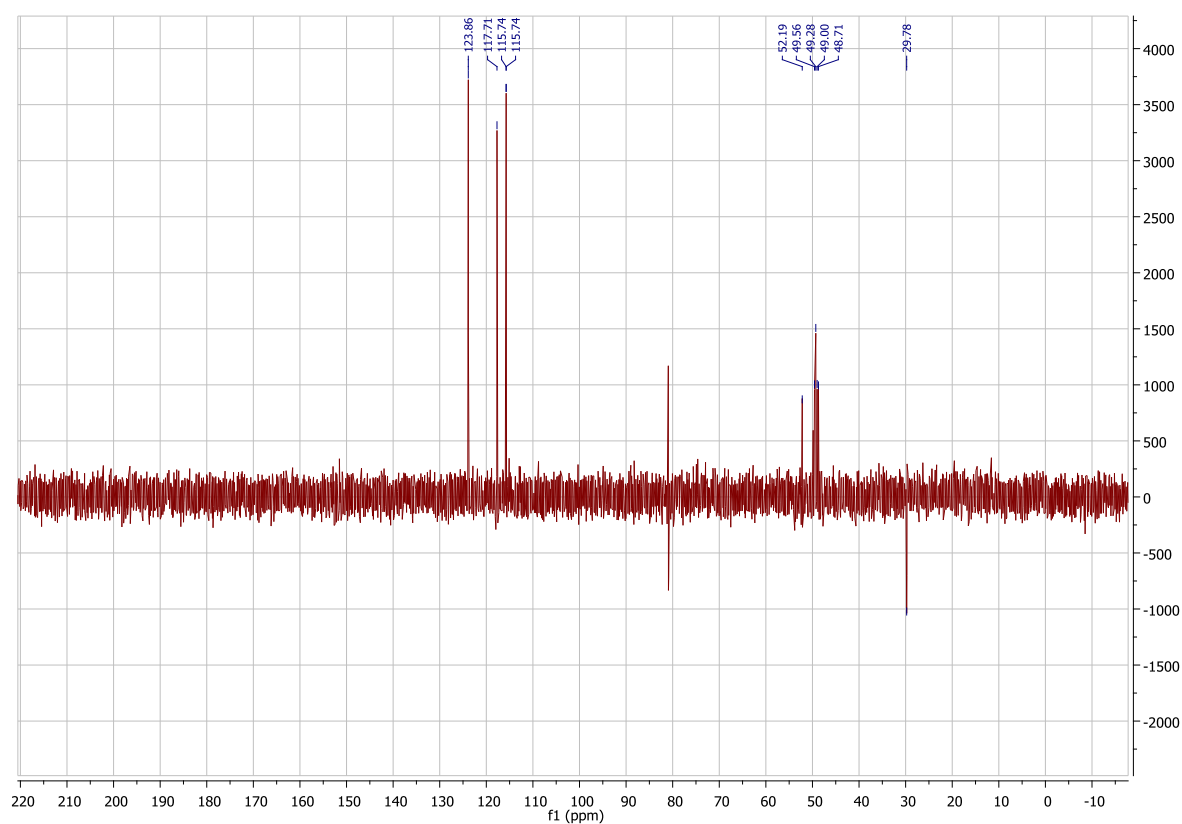
NMR-spektrum 7: <sup>1</sup>H-NMR-spektrum av E1.2.2.7 (CD<sub>3</sub>OD som løsningsmiddel).



NMR-spektrum 8: HMQC-spektrum av E1.2.2.7 (CD<sub>3</sub>OD som løsningsmiddel).

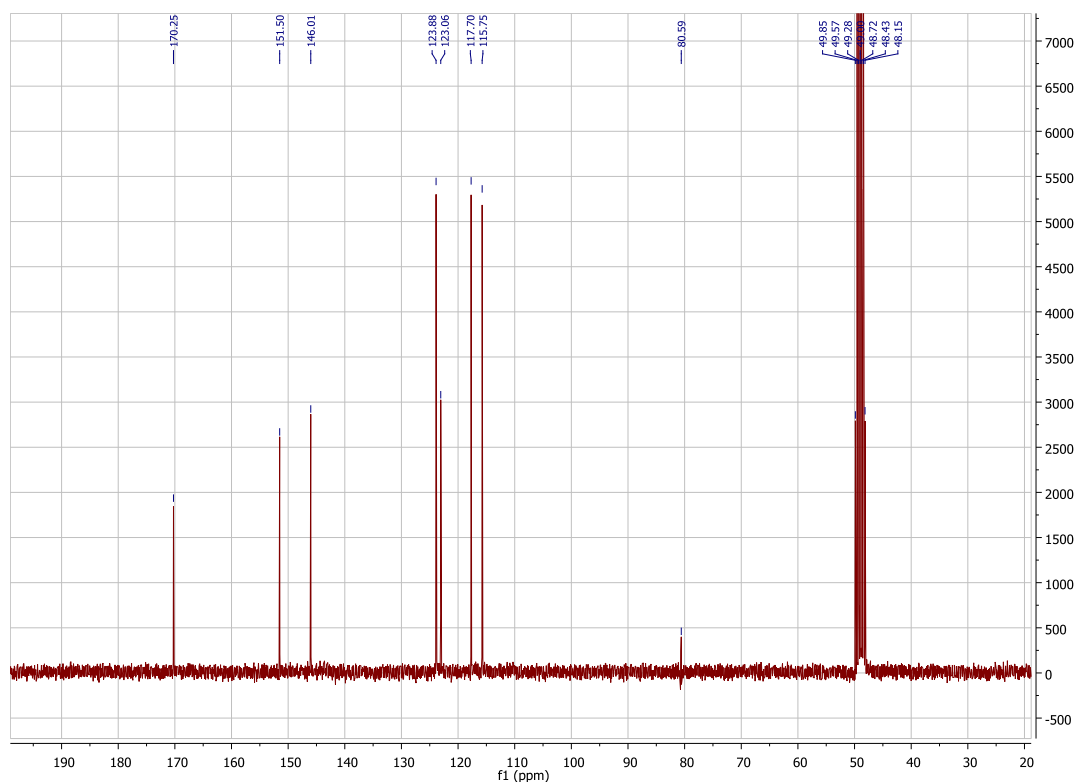


NMR-spektrum 9: <sup>13</sup>C NMR -spektrum av E1.2.2.7 (CD<sub>3</sub>OD som løsningsmiddel).

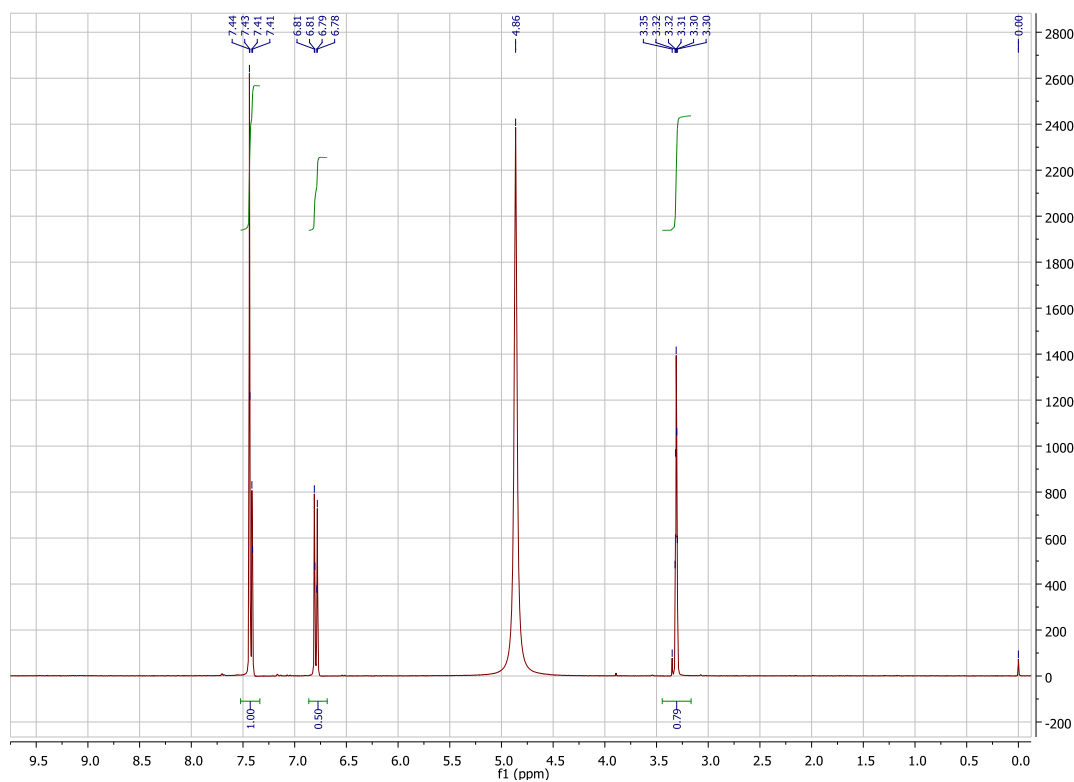


NMR-spektrum10: DEPT 135-spektrum av E1.2.2.7 (CD<sub>3</sub>OD som løsningsmiddel).

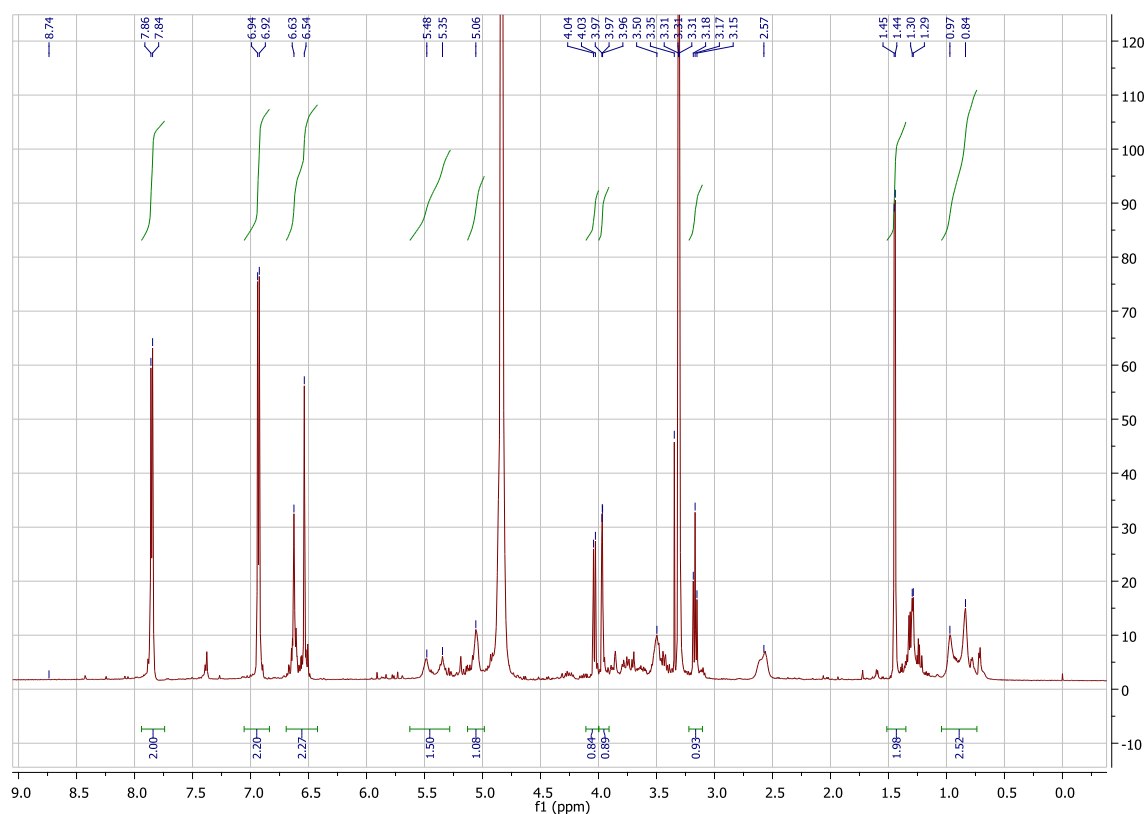




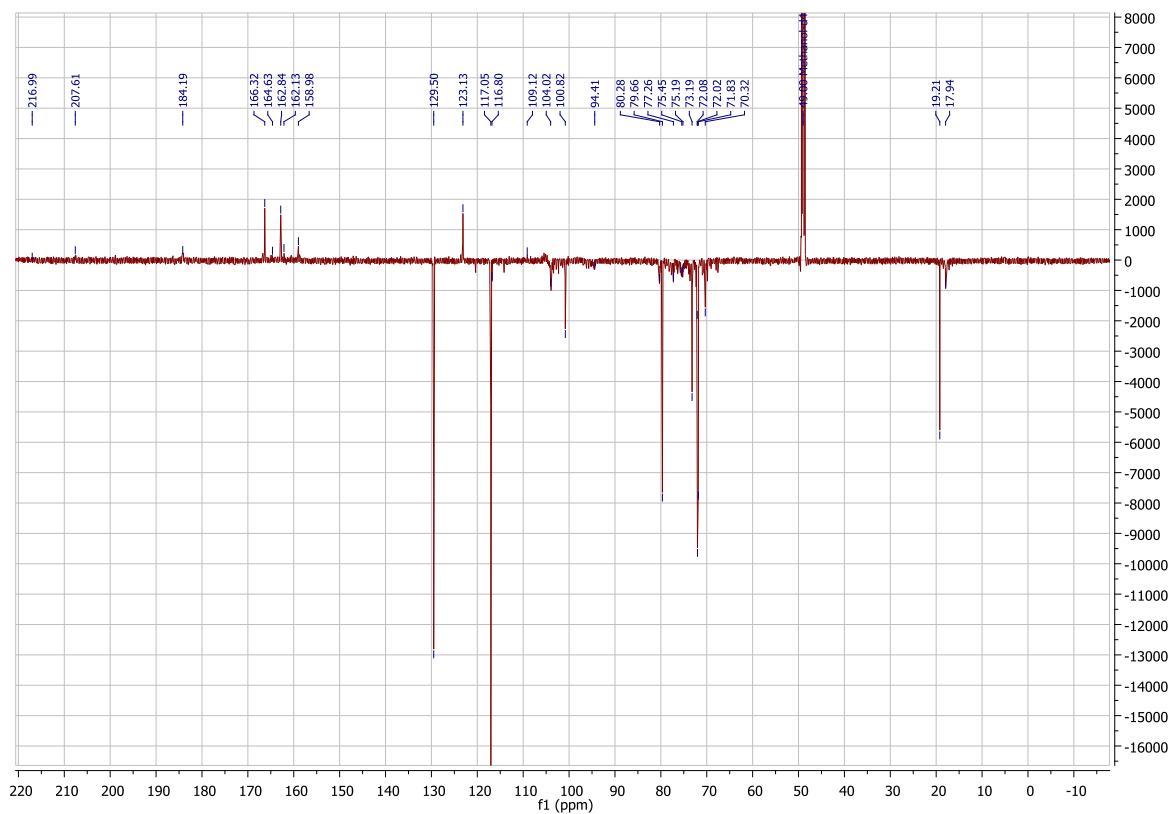
NMR-spektrum 11:  $^{13}\text{C}$  NMR -spektrum av 3,4-dihydroksybenzosyre ( $\text{CD}_3\text{OD}$  som løsningsmiddel).



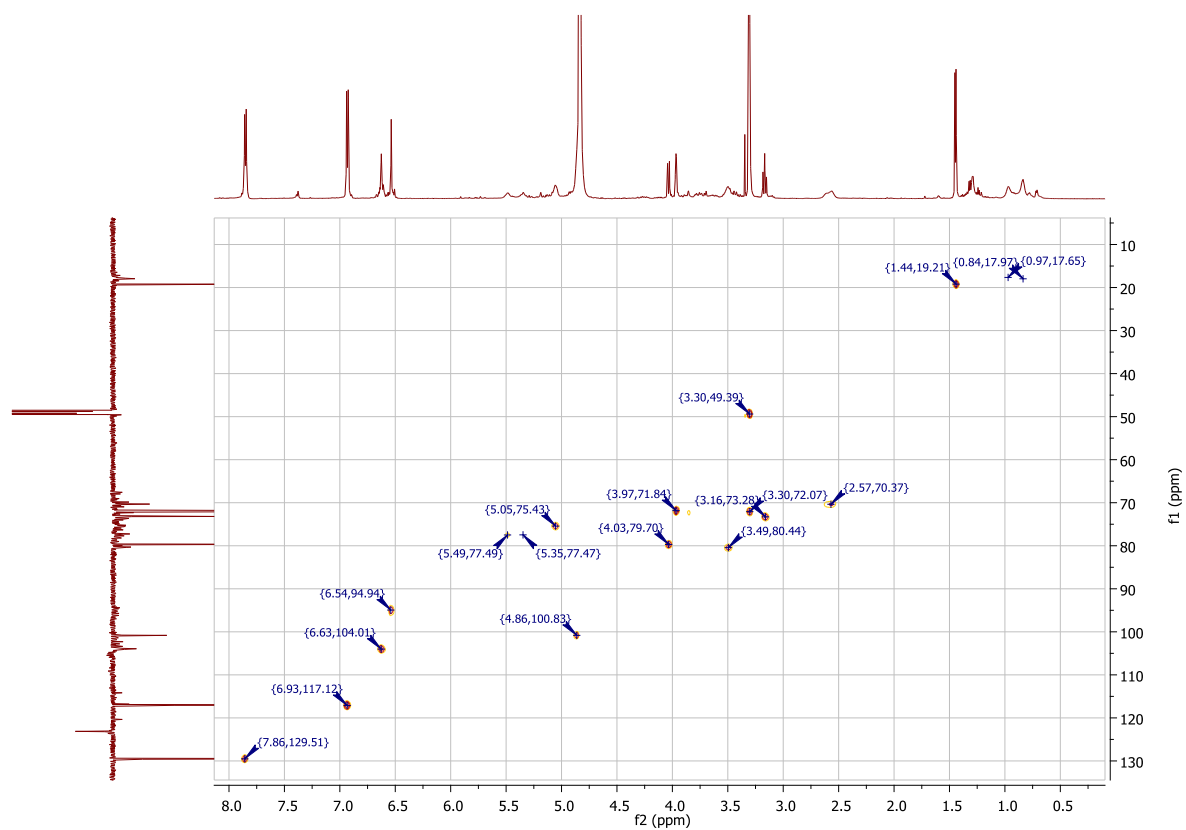
NMR-spektrum 12:  $^1\text{H}$ -NMR-spektrum av 3,4-dihydroksybenzosyre ( $\text{CD}_3\text{OD}$  som løsningsmiddel).



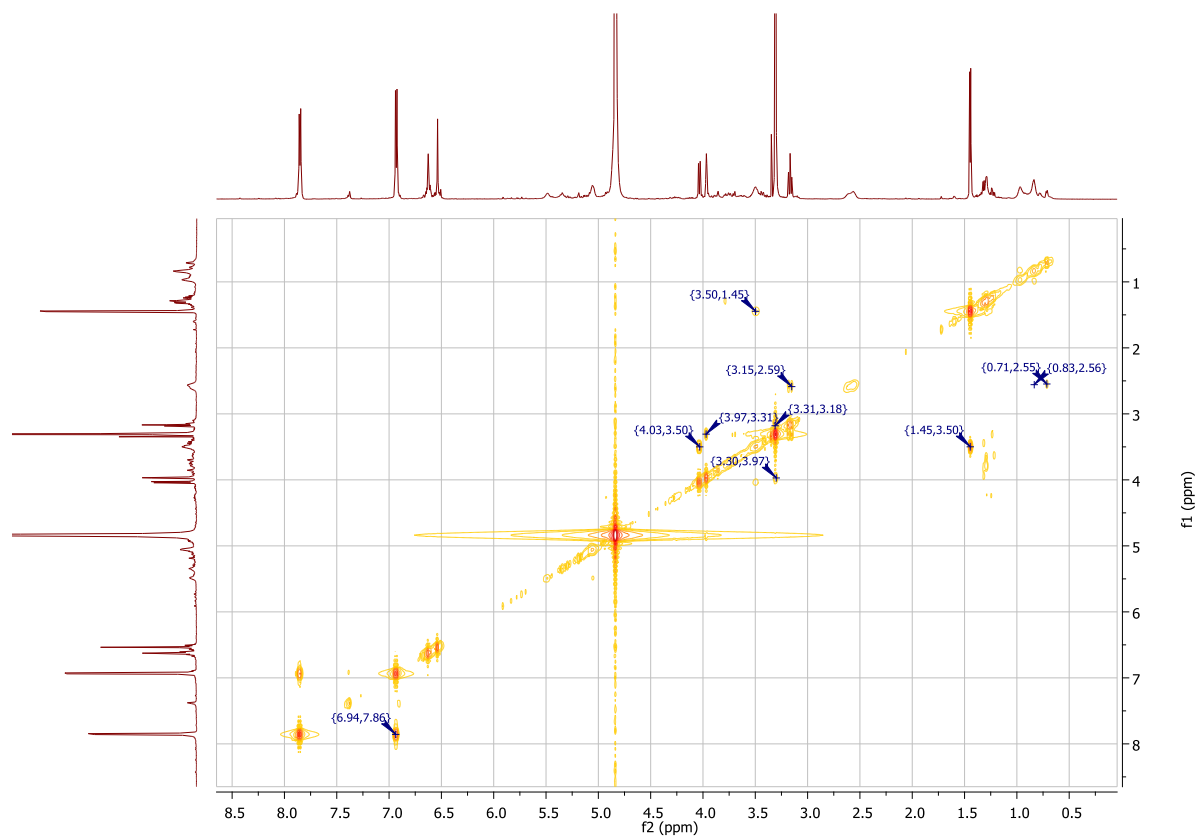
NMR-spektrum 13: <sup>1</sup>H-NMR-spektrum av E1.6.4.3.8.7 (CD<sub>3</sub>OD som løsningsmiddel).



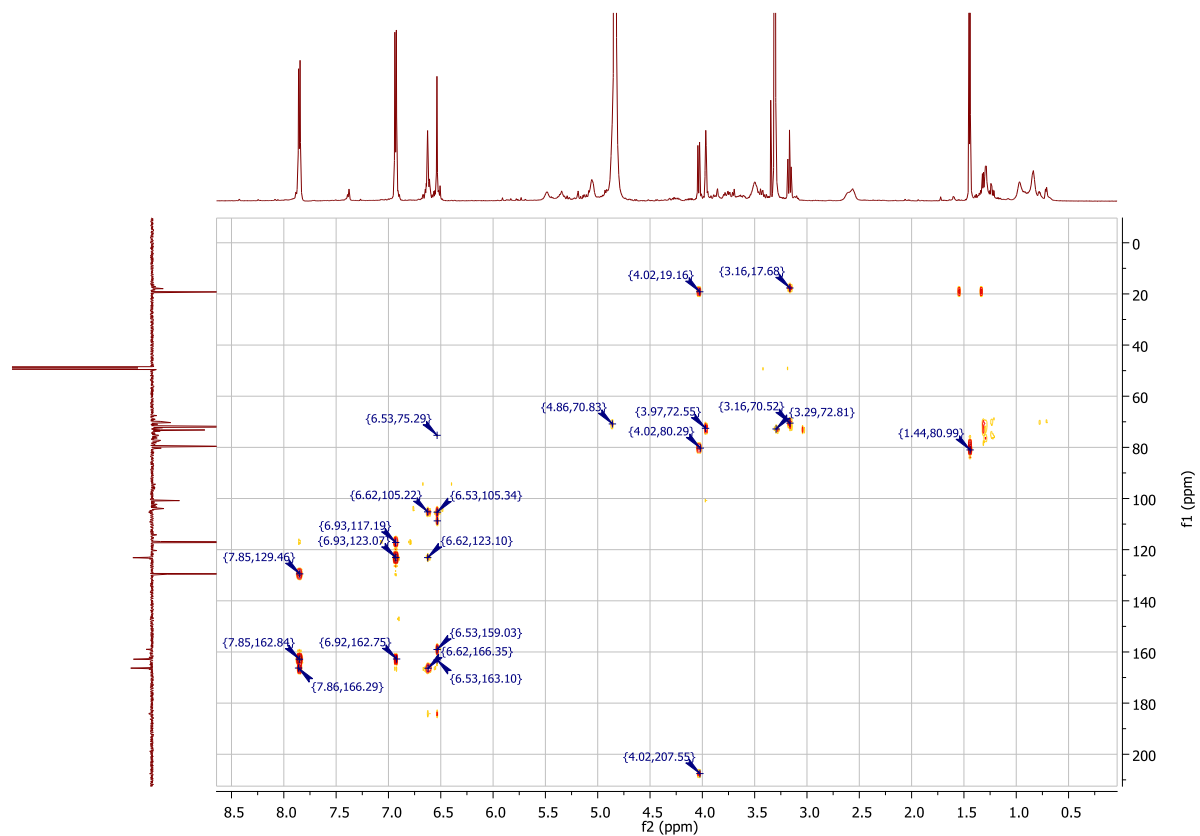
NMR-spektrum 14: APT-spektrum av E1.6.4.3.8.7 (CD<sub>3</sub>OD som løsningsmiddel).



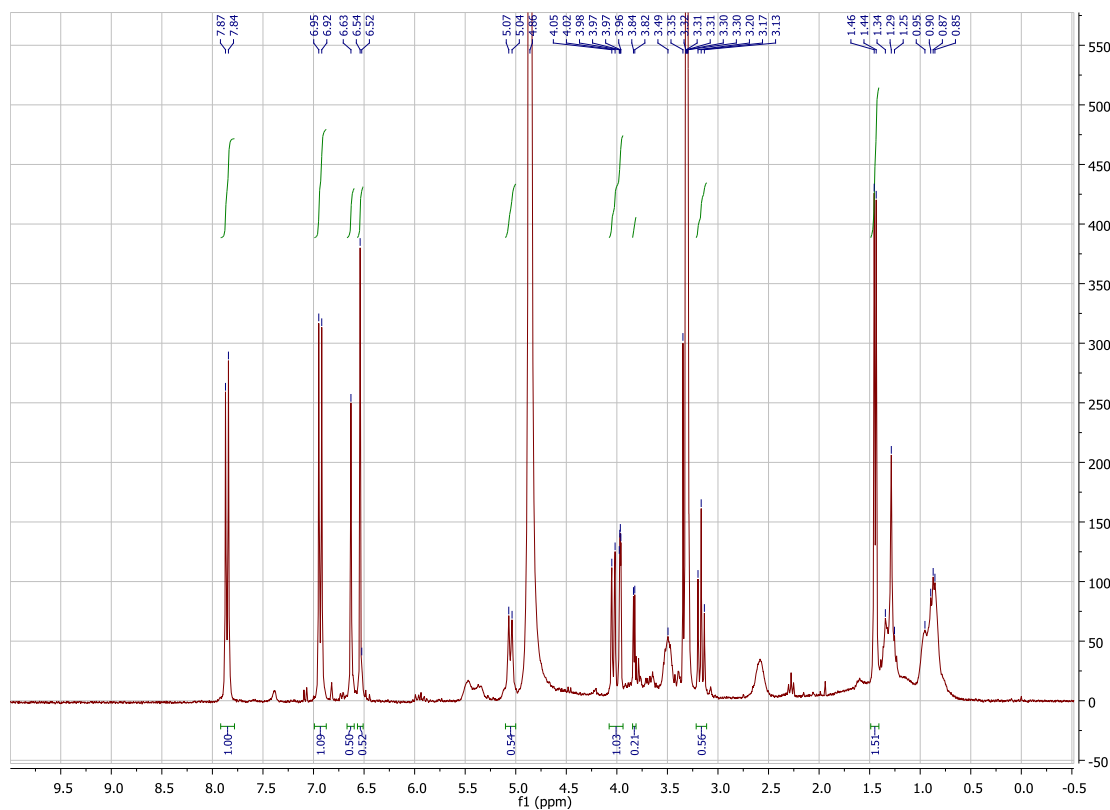
NMR-spektrum 15: HSQC -spektrum av E1.6.4.3.8.7 ( $\text{CD}_3\text{OD}$  som løsningsmiddel).



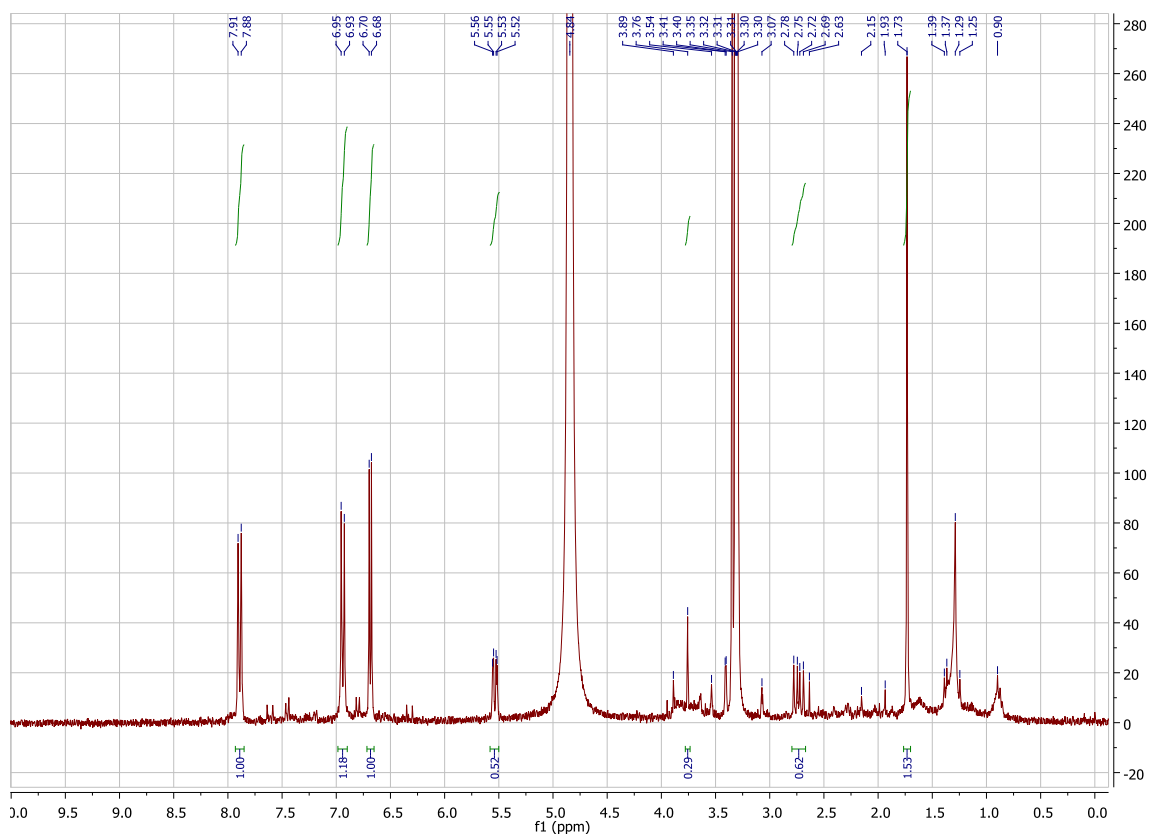
NMR-spektrum 16: COSY-spektrum av E1.6.4.3.8.7 ( $\text{CD}_3\text{OD}$  som løsningsmiddel).



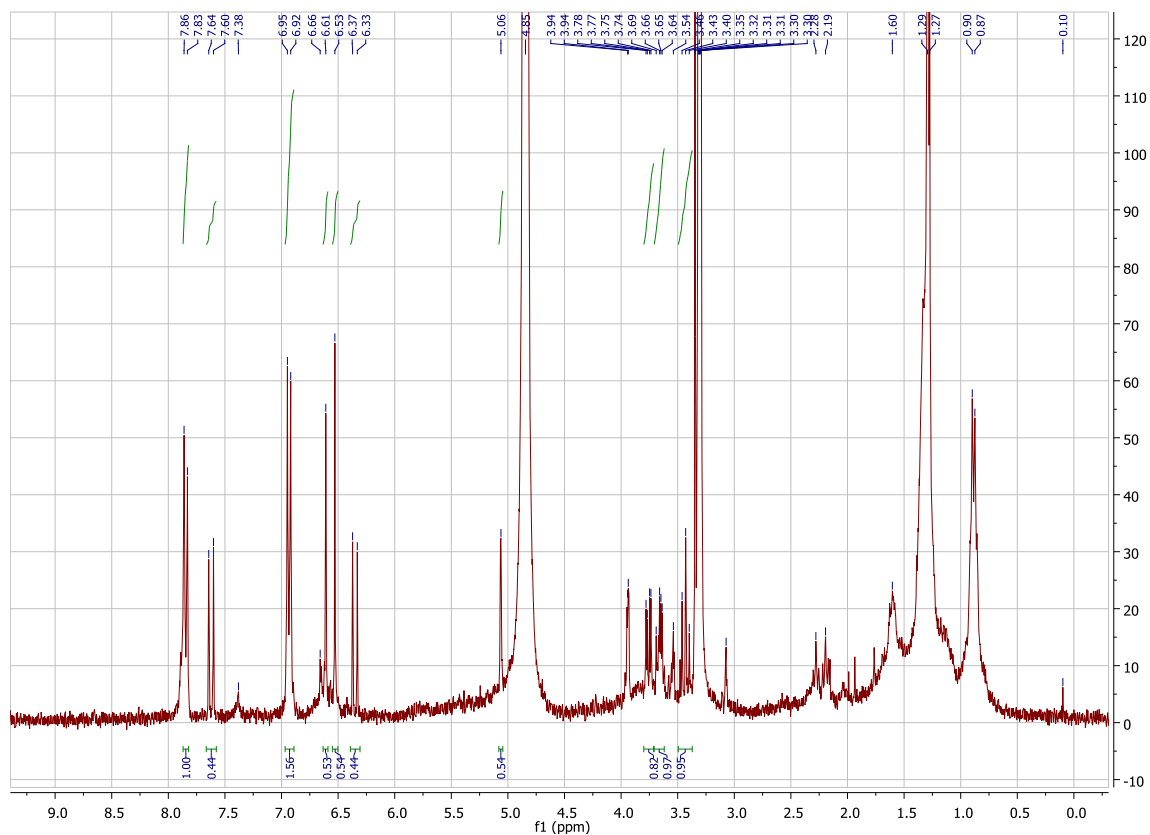
NMR-spektrum 17: HMBC-spektrum av E1.6.4.3.8.7 ( $\text{CD}_3\text{OD}$  som løsningsmiddel).



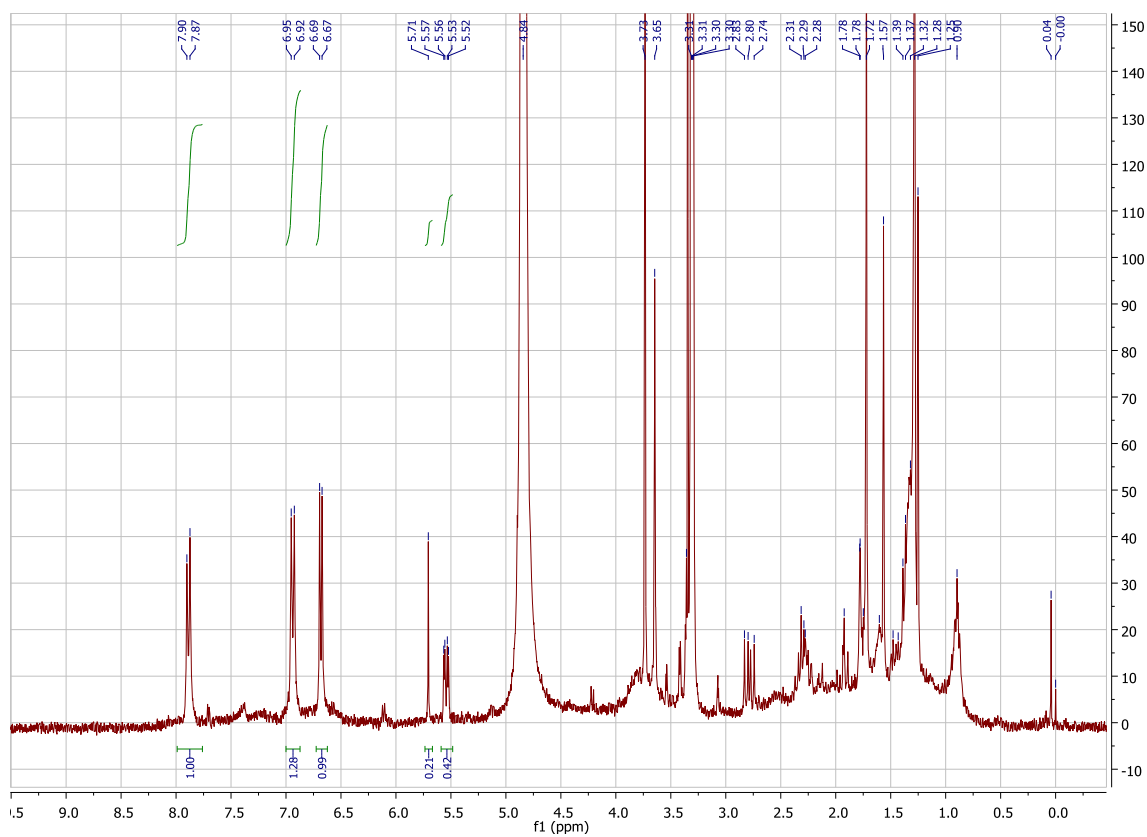
NMR-spektrum 18:  $^1\text{H}$ -NMR-spektrum av E4-5.2.5.4 ( $\text{CD}_3\text{OD}$  som løsningsmiddel).



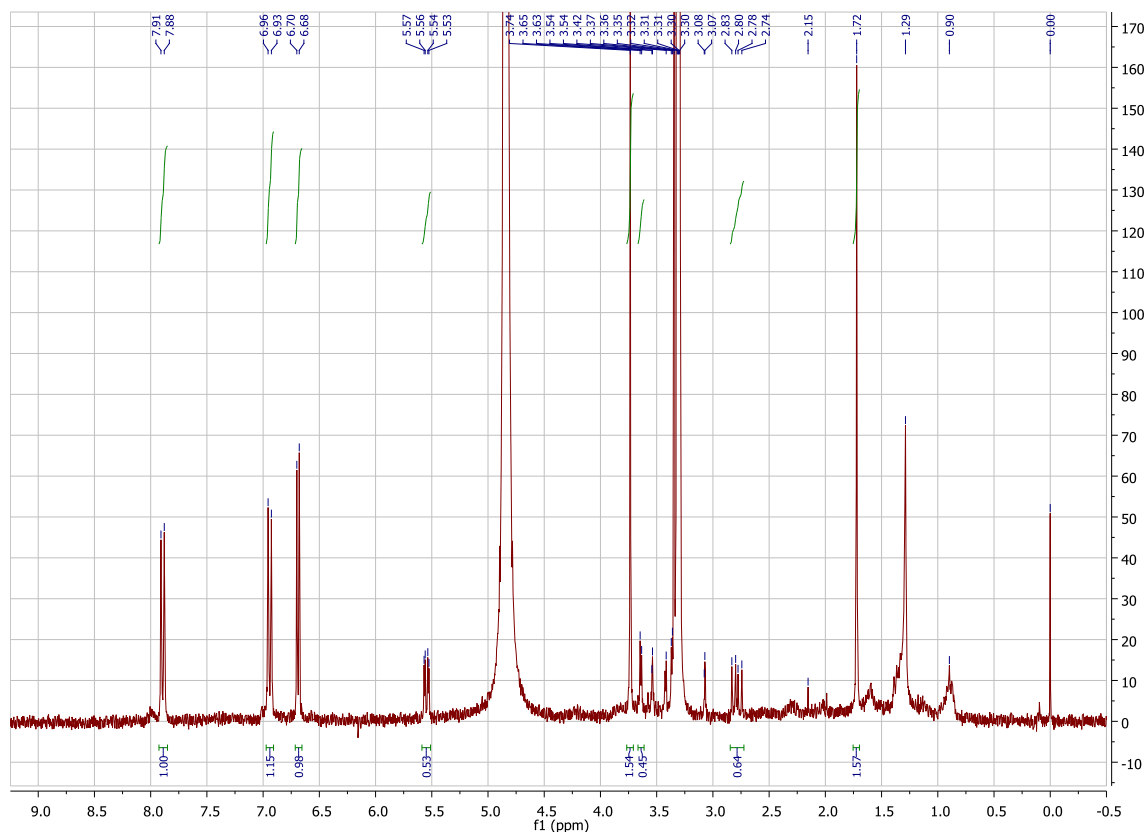
NMR-spektrum 19: <sup>1</sup>H-NMR-spektrum av E4-5.2.5.5 (CD<sub>3</sub>OD som løsningsmiddel).



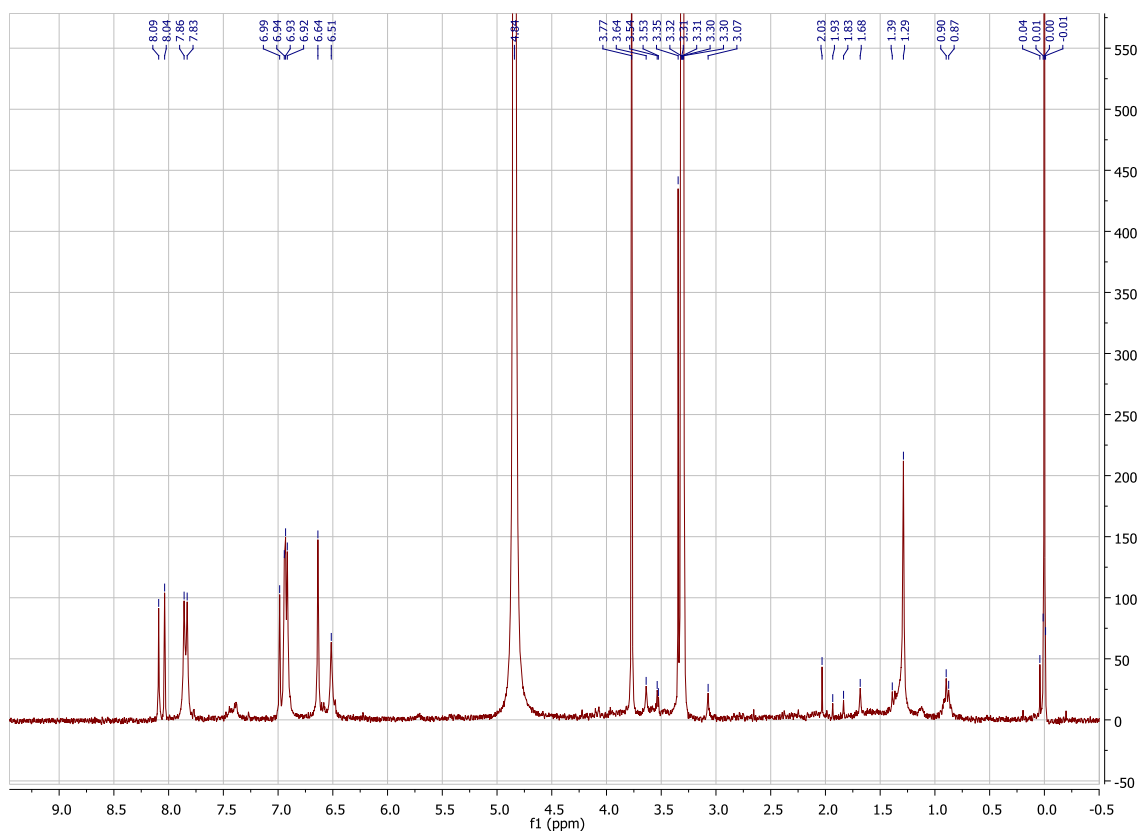
NMR-spektrum 20: <sup>1</sup>H-NMR-spektrum av E4-5.2.7.1 (CD<sub>3</sub>OD som løsningsmiddel).



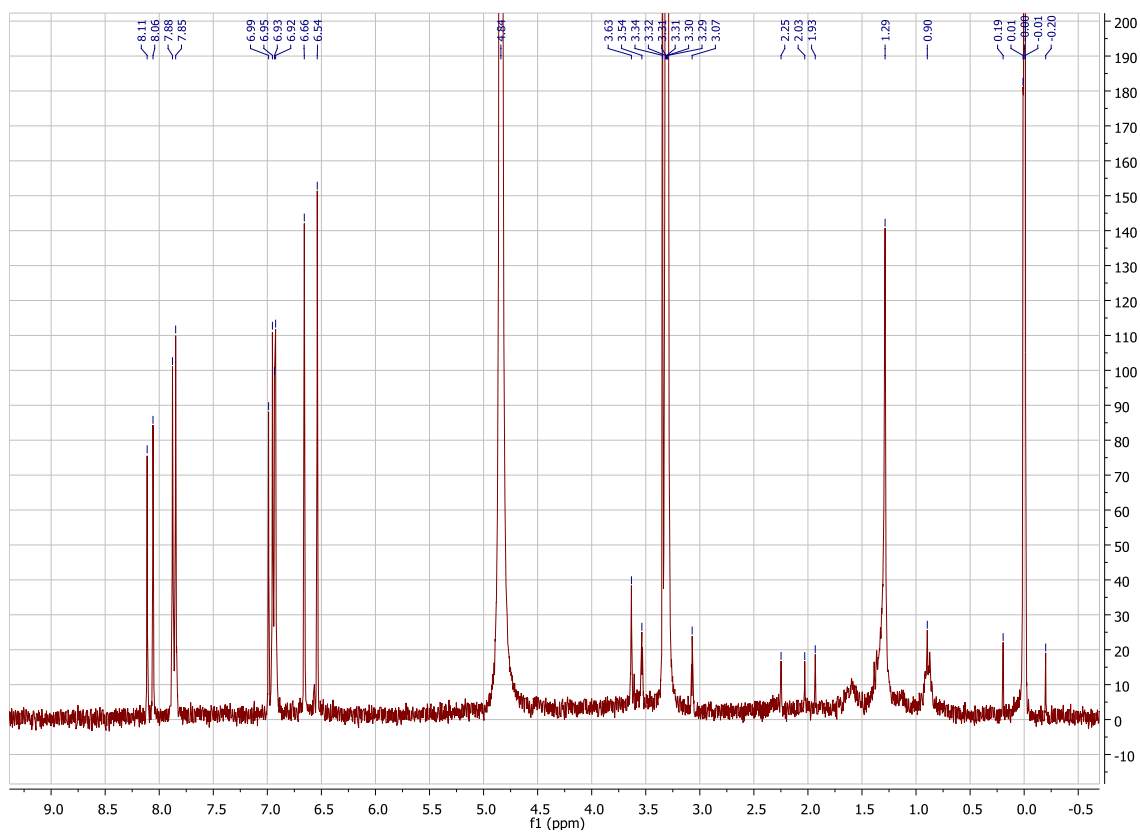
NMR-spektrum 21:  $^1\text{H}$ -NMR-spektrum av E4-5.3.5 ( $\text{CD}_3\text{OD}$  som løsningsmiddel).



NMR-spektrum 22:  $^1\text{H}$ -NMR-spektrum av E4-5.3.5.6 ( $\text{CD}_3\text{OD}$  som løsningsmiddel).



NMR-spektrum 23:  $^1\text{H}$ -NMR-spektrum av E6-8.10.1 ( $\text{CD}_3\text{OD}$  som løsningsmiddel).



NMR-spektrum 24:  $^1\text{H}$ -NMR-spektrum av E6-8.11A ( $\text{CD}_3\text{OD}$  som løsningsmiddel).

## 10. Kildeliste

- Akowuah, G., Zhari, I., Sadikun, A. og Norhayati, I., 2006, HPTLC densitometric analysis of *Orthosiphon stamineus*. Leaf extracts and inhibitory effect on xanthine oxidase activity. *Pharmaceutical Biology* 44, 65-70.
- Andersen, Ø.M. og Markham, K.R., red., 2006, *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*. CRC Press, Boca Raton.
- Aron, P.M. og Kennedy, J.A., 2008, Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition & Food Research* 52, 79-104.
- Beecher, G.R., 2003, Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *Journal of Nutrition* 133, 2348S-2354S.
- Bjørneboe, G.E.A., Drevon, C.A. og Norum, K.R., 2007, *Mat og medisin*, 5. utgave. Høyskoleforlaget, Kristiansand.
- Blois, M.S., 1958, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181, 1199-1200.
- Burkill, H.M., 1997, *The useful plants of West Tropical Africa*, Vol 4. Royal Botanic Gardens, Kew, s 336-338.
- CIA, 2011, "Central Intelligence Agency - The World Factbook - Mali" Aksessert 06.04.2011, <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/ml.html>.
- Cox, P.A. og Balick, M.J., 1994, The ethnobotanical approach to drug discovery. *Scientific American* 270, 82-87.
- Diallo, D. og Paulsen, B., 2000, *Pharmaceutical research and traditional practitioners in Mali: Experiences with benefit sharing*, I: Svarstad, H., Dhillon, S.S. (red.): *Bioprospecting. From biodiversity in the South to medicines in the North*. Spartacus forlag AS, Oslo, s. 133-144.
- Diallo, D., Sogn, C., Samaké, F.B., Paulsen, B.S., Michaelsen, T.E. og Keita, A., 2002, Wound healing plants in Mali, The Bamako region. An ethnobotanical survey and complement fixation of water extracts from selected plants. *Pharmaceutical Biology* 40, 117-128.
- Dobrian, A.D., Lieb, D.C., Cole, B.K., Taylor-Fishwick, D.A., Chakrabarti, S.K. og Nadler, J.L., 2010, Functional and pathological roles of the 12- and 15-lipoxygenases. *Progress in Lipid Research* 50, 115-131.
- García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, M.A. og Martínez, J.A., 2009, Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research* 58, 537-552.



- Gleason, M.M., Rojas, C.J., Learn, K.S., Perrone, M.H. og Bilder, G.E., 1995, Characterization and inhibition of 15-lipoxygenase in human monocytes: comparison with soybean 15-lipoxygenase. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 268, C1301-C1307.
- Global biodiversity information facility, 2011, *Biophytum petersianum*. Aksessert 05.04.2011, <http://data.gbif.org/search/biophytum%20petersianum>.
- Grønhaug, T.E., 2006, Antioksidanter i *Xylocarpus moluccensis*, en medisinsplante fra mangroveskogen i Bangladesh. Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, Cand. Pharm. avhandling.
- Grønhaug, T.E., Glaeserud, S., Skogsrud, M., Ballo, N., Bah, S., Diallo, D. og Paulsen, B.S., 2008, Ethnopharmacological survey of six medicinal plants from Mali, West-Africa. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 4, 26.
- Gutteridge, J.M.C. og Halliwell, B., 1994, Antioxidants in nutrition, health, and disease. Oxford University Press, Oxford.
- Halliwell, B., 2005, Free radicals and other reactive species in disease, Aksessert 23.03.2011, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0003913/full>.
- Hariadi, B.T. og Santoso, B., 2009, Evaluation of tropical plants containing tannin on in vitro methanogenesis and fermentation parameters using rumen fluid. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 456-461.
- Hatano, T., Mizuta, S., Ito, H. og Yoshida, T., 1999, C-glycosidic flavonoids from *Cassia occidentalis*. *Phytochemistry* 52, 1379-1383.
- Hedding, B., 2007, *Erythrina senegalensis*-en medisinsplante fra Mali. Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, Cand. Pharm. avhandling.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R. og Bobilya, D.J., 2002, Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 572-584.
- Heinrich, M., 2003, Ethnobotany and natural products: the search for new molecules, new treatments of old diseases or a better understanding of indigenous cultures? *Current Topics in Medicinal Chemistry* 3, 141-154.
- Inngjerdingen, K., Nergard, C.S., Diallo, D., Mounkoro, P.P. og Paulsen, B.S., 2004, An ethnopharmacological survey of plants used for wound healing in Dogonland, Mali, West Africa. *Journal of Ethnopharmacology* 92, 233-244.
- Inngjerdingen, K.T., Coulibaly, A., Diallo, D., Michaelsen, T.E. og Paulsen, B.S., 2006, A complement fixing polysaccharide from *Biophytum petersianum* Klotzsch, a medicinal plant from Mali, West Africa. *Biomacromolecules* 7, 48-53.

- Inngjerdingen, M., Inngjerdingen, K.T., Patel, T.R., Allen, S., Chen, X., Rolstad, B., Morris, G.A., Harding, S.E., Michaelsen, T.E., Diallo, D. og Paulsen, B.S., 2008, Pectic polysaccharides from *Biophytum petersianum* Klotzsch, and their activation of macrophages and dendritic cells. *Glycobiology* 18, 1074-1084.
- ITIS Report, 2011, *Biophytum* DC. Aksessert 05.04.2011, [http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=29101](http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=29101).
- Iwu, M.M., 2002, Ethnobotanical approach to pharmaceutical drug discovery: Strengths and limitations. *Advances in Phytomedicine* 1, 309-320.
- Kitanaka, S. og Takido, M., 1992, Demethyltorosaflavones C and D from *Cassia nomame*. *Phytochemistry* 31, 2927-2929.
- Kodjo, K.M., Contesse, V., Do Rego, J.L., Aklikokou, K., Titrikou, S., Gbeassor, M. og Vaudry, H., 2006, In vitro effects of crude extracts of *Parkia biglobosa* (Mimosaceae), *Stereospermum kunthianum* (Bignoniaceae), and *Biophytum petersianum* (Oxalidaceae) on corticosteroid secretion in rat. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 100, 202-208.
- Kokwaro, J.O., 1993, Medicinal plants of East Africa. Kenya literature bureau, Nairobi, s 184.
- Lourteig, A., 1981, *Biophytum umbraculum* (Oxalidaceae). *Brittonia* 33, 451-452.
- Lyckander, I.M. og Malterud, K., 1996, Lipophilic flavonoids from *Orthosiphon spicatus* prevent oxidative inactivation of 15-lipoxygenase. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 54, 239-246.
- Malterud, K.E., 1998, Procedure for assay of 15-lipoxygenase inhibition. Internt notat, Farmasøytisk Institutt, Seksjon for Farmakognosi, Universitetet i Oslo.
- McKay, D.L. og Blumberg, J.B., 2006, A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytotherapy Research* 20, 519-530.
- Meneshian, A. og Bulkley, G.B., 2002, The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction. *Microcirculation* 9, 161-175.
- Mladenka, P., Zatloukalova, L., Filipsky, T. og Hrdina, R., 2010, Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine* 49, 963-975.
- Mouzou, A., Titrikou, S., Constantin, B., Seville, S., Cognard, C., Gbeassor, M. og Raymond, G., 2010, Effets du décocté de *Biophytum petersianum* (Oxalidaceae) sur la libération du calcium du réticulum sarcoplasmique des cellules musculaires squelettiques. *Phytothérapie* 8, 231-235.

- Pacher, P., Nivorozhkin, A. og Szabó, C., 2006, Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacological Reviews* 58, 87-114.
- Pedersen-Bjergaard, S. og Rasmussen, K.E., 2004, Legemiddelanalyse. Fagbokforlaget, Oslo.
- Pham, A.T., 2009, Kjemiske og biokjemiske studier av den maliske medisinsplanter *Terminalia macroptera*. Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, Cand. Pharm. avhandling.
- Pieters, L. og Vlietinck, A.J., 2005, Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds? *Journal of Ethnopharmacology* 100, 57-60.
- Prelude medicinal plants database, 2011, bilder. Aksessert 05.04.2011, [http://www.metafro.be/prelude/view\\_plant?pi=01740](http://www.metafro.be/prelude/view_plant?pi=01740).
- Rang, H., Dale, M., Ritter, J. og Flower, R., 2007, Rang and Dale's Pharmacology, 6. utgave. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Santoso, B., Kilmaskossu, A. og Sambodo, P., 2007, Effects of saponin from *Biophytum petersianum* Klotzsch on ruminal fermentation, microbial protein synthesis and nitrogen utilization in goats. *Animal Feed Science and Technology* 137, 58-68.
- Scott, K.N., 1972, Carbon-13 nuclear magnetic resonance of biologically important aromatic acids. I. Chemical shifts of benzoic acid and derivatives. *Journal of the American Chemical Society* 94, 8564-8568.
- Shukla, S. og Gupta, S., 2010, Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. *Pharmaceutical Research* 27, 962-978.
- Solomons, T.W.G. og Fryhle, C.B., 2004, Organic chemistry, 8. utgave. J. Wiley & Sons, Hoboken.
- Store Norske leksikon, 2011, Mali. Aksessert 05.04.2011, <http://snl.no/Mali>.
- Sveaass, A.M., 2007. Immunmodulerende polysakkarider isolert fra *Biophytum petersianum* Klotzsch; Etnofarmakologiske studier i Mali. Hovedfagsavhandling i farmakognosi.
- Takahashi, Y., Zhu, H. og Yoshimoto, T., 2005, Essential roles of lipoxygenases in LDL oxidation and development of atherosclerosis. *Antioxidants & Redox Signaling* 7, 425-431.
- Titrikou, S., Eklu-Gadegbeku, K., Aklikokou, K. og Gbeassor, M., 2008, Effets de *Biophytum petersianum* (Oxalidaceae) sur la pression artérielle chez le rat Wistar. *Phytothérapie* 6, 215-218.
- Titrikou, S., Eklu-Gadegbeku, K., Mouzou, A., Aklikokou, K. og Gbeassor, M., 2007, Calcium antagonistic activity of *Biophytum petersianum* on vascular smooth muscles of Wistar rat. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics* 6, 185-189.

- Uchiumi, F., Hatano, T., Ito, H., Yoshida, T. og Tanuma, S., 2003, Transcriptional suppression of the HIV promoter by natural compounds. *Antiviral Research* 58, 89-98.
- Utenova, B.T., Malterud, K.E. og Rise, F., 2007, Antioxidant activity of O-protected derivatives of (-)-epigallocatechin-3-gallate: inhibition of soybean and rabbit 15-lipoxygenases. *ARKIVOC* 9, 6-16.
- Van Hoyweghen, L., Karalic, I., Van Calenbergh, S., Deforce, D. og Heyerick, A., 2010, Antioxidant flavone glycosides from the leaves of *Fargesia robusta*. *Journal of Natural Products* 73, 1573-1577.
- Wikipedia, 2011, Mali, Aksessert 05.04.2011, <http://no.wikipedia.org/wiki/Mali>.
- Zhang, H.L., Nagatsu, A., Okuyama, H., Mizukami, H. og Sakakibara, J., 1998, Sesquiterpene glycosides from cotton oil cake. *Phytochemistry* 48, 665-668.
- Zhao, J., Pawar, R.S., Ali, Z. og Khan, I.A., 2007, Phytochemical investigation of *Turnera diffusa*. *Journal of Natural Products* 70, 289-292.